

ANNEE 1960-1961

Série : E
N° 102

THESES
pour l'obtention du
GRADE DE DOCTEUR D'ETAT EN PHARMACIE
par

TRAN BA LOC

Pharmacien, ancien interne des Hôpitaux de Paris
Docteur ès-Sciences
Attaché de recherches au C.N.R.S.
Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine

Première Thèse :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CHIMIOThERAPIE ANTITUBERCULEUSE:

- 1 - Influence des substances réductrices (Thiocarbohydrazide, Réductone et Rongalite) sur la croissance du Bacille de Koch.
- 2 - Etude spéciale d'une substance antituberculeuse à groupement réducteur: le sel sodique de N-(méthylène-sulfoxyate) isonicotinoylhydrazide.

Deuxième Thèse :

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 11 Avril 1961, devant la Commission d'examen

Jury : - MM. R. PARIS, Président
- R. MOREAU) Examineurs
- A. GERMAN)

ANNEE 1960-1961

Série : E

N° 102

THESES

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR D'ETAT EN PHARMACIE

par

TRAN BA LOC

Pharmacien, ancien interne des Hôpitaux de Paris

Docteur ès-Sciences

Attaché de recherches au C.N.R.S.

Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine

Première Thèse :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CHIMIOThERAPIE ANTITUBERCULEUSE:

- 1 - Influence des substances réductrices (Thiocarbohydrazide, Réductone et Rongalite) sur la croissance du Bacille de Koch.
- 2 - Etude spéciale d'une substance antituberculeuse à groupement réducteur: le sel sodique de N-(méthylène-sulfoxy) isonicotinoylhydrazide.

Deuxième Thèse :

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 11 Avril 1961, devant la Commission d'examen

Jury : - MM. R. PARIS, Président
- R. MOREAU)
- A. GERMAN) Examineurs

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. G. VALETTE	- Doyen  ,  I
M. M. JANOT	- Assesseur  ,  , I
G. CUVIER	- Secrétaire Général  ,  I
L. JEANDEL	- Secrétaire Général - Adjoint  I
Mme S. CERTAIN	- Secrétaire  I
Mme M. L. ESPINASSE	- Secrétaire  I

DOYEN HONORAIRE

M. René FABRE	C  ,  C, Membre de l'Institut.
---------------	--

PROFESSEURS HONORAIRES

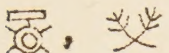
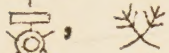
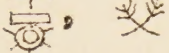
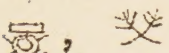
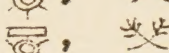
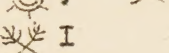
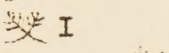
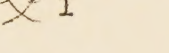
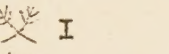
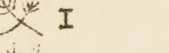
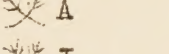
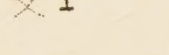
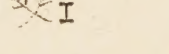
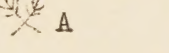
M. René FABRE	C  ,  C, Membre de l'Institut
DELEPINE	C  ,  I, Membre de l'Institut
LAUNOY	O  ,  I
FLEURY	O  ,  I
MASCRE	O  ,  C
PICON	O  ,  I
BEDEL	 :  I



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550219_0001

PROFESSEURS

MM. M-M. JANOT	-		I - Pharmacie Galénique (T.)
G. VALETTE	-		I - Pharmacodynamie (T.)
R. PARIS	-		I - Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T.)
M. GUILLOT	-		I - Physique (T.)
J. GAUTIER	-		I - Chimie organique (T.)
Mlle S. LAMBIN	-		I - Microbiologie (T.)
MM. Y. RAOUL	-		I - Zoologie appliquée (T.)
J. COURTOIS	-		I - Chimie biologique (T.)
L. DOMANGE	-		I - Chimie minérale (T.)
P. CRETE	-		I - Botanique (T.)
R. TRUHAUT	- 0		I - Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
A. MORETTE	-		I - Hydrologie (T.)
R. CAVIER	-		I - Parasitologie (T.)
A. QUEVAUVILLER	-		I - Hygiène (T.)
R. MOREAU	-		I - Pharmacie chimique (T.)
MM. J. GUY	-		I - Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.)
A. GERMAN	-		I - Virologie et Sérologie (T.P.)
M. PIETTE	-		I - Biologie sanguine (T.P.)
P. MALANGEAU	-		A - Chimie analytique (T.)
M. GIRARD	-		I - Chimie appliquée à l'expertise (T.)
G. DILLEMANN	-		- Législation, déontologie, histoire de la Pharmacie (T.)
G. DEYSSON	-		I - Professeur sans chaire.
J. FLAHAUT	-		" "
A. LE HIR	-		" "
J. RENAULT	-		A " "

MAITRES DE CONFERENCES

MM. P. LARUELLE	-	Physique
G. LE MOAN	-	Toxicologie
P. ROSSIGNOL	-	Pharmacodynamie

H. RENAULT - ✕ A

G. PAOLETTI

A. MANGEOT - ✕ A

P. DELAVEAU

C. BOUDENE

A. DESVIGNES - ✕ A

F. PERCHERON

J.N. SAVEL

P. REYNAUD

J. BORY

- Pharmacie chimique

- Radioisotopes - Applications à la
Biologie et à la Pharmacie

- Chimie analytique

- Biologie végétale

- Toxicologie et Hygiène industrielles

- Microbiologie

- Biochimie

- Sciences naturelles

- Sciences physico-chimiques

- Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. P. CORRIEZ - ✕ I

J. DUCHENNE

J. GARDENT

P. GESTEAU - ✕ ✕ I

J. HARISPE - ✕ I

J. HENRY

M. LECLERC - ✕ A

R. LELUC

M. LEMONNIER

- Physique

- Microbiologie

- Chimie analytique - 1ère année

- Physique biologique

- Chimie générale et pharmaceutique

- Chimie - 4ème année

- Chimie biologique

- Microbiologie

- Chimie analytique (2ème et 3ème
années)

- Service des examens de chimie

- Chimie analytique (2ème et 3ème
années)

- Pharmacie galénique industrielle

- Hématologie

- Sérologie

- Biologie végétale

- Parasitologie

MlleS. LONGUEVALLE - ✕ I

MM. P. PELLERIN

R. POTTIER - ✕ A

P. POULLAIN

Mme M. ROBERT

Mlle A. ROLLEN - ✕ ✕ A

M. N.....

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M. A. CAVE

- Chef de travaux de Pharmacotechnie
galénique

Mle H. MORIN -  A

- Chef de travaux de Pharmacodynamie

M. ROBBA

- Chef de travaux de Pharmacotechnie
chimique

BIBLIOTHEQUE

M.	GARNIER	-		,		I	- Conservateur, chargé de la Direction
Mle	LAVAUD	-				I	- Conservateur
Mnes	DESGRIPPES	-				A	- Bibliothécaire
	KREHMER	-				A	- Bibliothécaire

A Monsieur le Professeur R. PARIS,

qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être
Président du Jury.

A Monsieur le Professeur R. MOREAU,

qui a accepté d'être membre du Jury.

A Monsieur le Professeur A. GERMAN,

à qui nous devons notre formation durant notre Internat
en Pharmacie, et les conseils qu'il nous a prodigués
avec une constante sollicitude pour la réalisation
de cette thèse.

Nous exprimons notre respectueuse reconnaissance.

Meis et Amicis

PREMIERE PARTIE
=====

INTRODUCTION A LA CHIMIOOTHERAPIE
ANTITUBERCULEUSE .

PLAN DE LA PREMIERE PARTIE

- I - HISTORIQUE
- II - METHODES D'ETUDE DE NOUVELLES SUBSTANCES
ANTITUBERCULEUSES
- III - CLASSIFICATION DES SUBSTANCES TUBERCULOSTA-
TIQUES
- IV - MECANISME D'ACTION DES SUBSTANCES TUBERCU-
LOSTATIQUES CONNUES.
- V - ETUDES FAITES DANS LE PRESENT TRAVAIL.

I - HISTORIQUE

Bien que Robert Koch ait découvert dès 1872 l'agent responsable de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, famille des Mycobactériacées, la chimiothérapie antituberculeuse n'a trouvé sa voie véritable que depuis une quinzaine d'années avec la mise en évidence de l'activité mycobactériostatique de l'acide para-aminosalicylique par Lehmann, suivie d'une série de substances dites tuberculostatiques. Aussi loin que l'on remonte dans l'histoire de la thérapeutique de la tuberculose, cette redoutable maladie n'était traitée que par des métaux lourds ou leurs sels. Comme pour la chimiothérapie des cancers et des leucémies, dès l'antiquité, on introduisait les sels d'arsenic comme drogues utilisées pour combattre la phtisie. Plus tard, Paracelse utilise l'or et le mercure. Robert Koch lui-même en 1890, dans une communication au Congrès International de Berlin, montrait la haute activité bactéricide du cyanure double d'or et de potassium sur les cultures de *Mycobacterium tuberculosis*. Malgré quelques rares succès cliniques, les sels et les dérivés de ce métal noble font l'objet de nombreux travaux parmi lesquels nous citerons ceux de Möllgard sur la sanachryline et ceux de Lumière sur l'allochryline.

II - METHODES D'ETUDE DE NOUVELLES SUBSTANCES ANTITUBERCULEUSES

Le triage de ces substances tuberculostatiques peut, en première approximation, être effectué par une épreuve *in vitro*. Il est important de fixer les conditions opératoires : la quantité de l'inoculat, le choix de la couche et le milieu de culture.

Les épreuves *in vivo* sont le plus souvent effectuées chez le Cobaye. Une épreuve préliminaire porte sur 6 à 10 animaux. Elle consiste à les infecter à raison de 0,1 mg de bacilles par voie sous-cutanée, puis à commencer

le traitement deux semaines après l'inoculation. Un deuxième groupe d'animaux non traités et un troisième groupe d'animaux recevant un traitement d'efficacité déjà connue (isoniazide par exemple) servent de témoins. Les examens anatomo-pathologiques macroscopiques et histologiques, effectués à chaque décès et en tout cas au 60ème jour, après sacrifice, de tous les animaux survivants, donnent une première estimation de l'activité *in vivo*.

Si les résultats sont satisfaisants, on soumet la substance à une 2ème épreuve très sévère. Chaque groupe comportant 20 animaux au moins sont infectés par voie sous-cutanée avec 0,001 mg de bacille. Quarante jours plus tard, on pratique une épreuve intra-cutanée à la tuberculine et l'on écarte les animaux qui éventuellement n'y réagiraient pas. On commence le traitement seulement à partir du 45ème jour jusqu'à ce que tous les témoins soient morts. On peut poursuivre le traitement pendant 5 à 6 mois. En plus de l'examen anatomo-pathologique, on recherche, cette fois, la présence éventuelle de bacilles virulents chez les animaux traités, en injectant des fractions de leur rate à des animaux neufs. Comme nous voyons, les épreuves effectuées chez le Cobaye ont l'inconvénient d'être longue et d'exiger une quantité importante de substances.

On s'est efforcé, durant ces dernières années; de mettre au point des méthodes utilisant la Souris (25). Toutefois, l'évolution de la tuberculose chez la Souris s'avère assez différente de celle de l'homme. Plus récemment, on a proposé une épreuve utilisant la pathogénicité d'une souche aviaire pour Boulet.

III - CLASSIFICATION DES SUBSTANCES TUBERCULOSTATIQUES

Nous pouvons diviser en cinq groupes les produits qui se sont montrés efficaces sur les essais *in vitro* et *in vivo* :

1° sulfones;

- 2°) thiosemicarbazones;
- 3°) hydrazide de l'acide isonicotiniques et dérivés;
- 4°) acide para-amino-salicylique et dérivés;
- 5°) antibiotiques : streptomycine, cyclosérine, kanamycine;
- 6°) substances diverses.

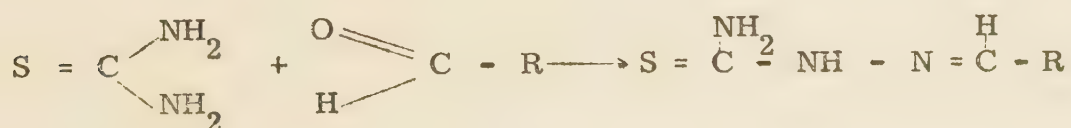
1°) Les sulfones :

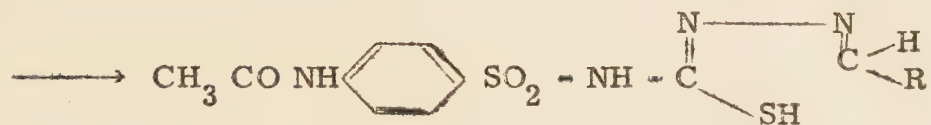
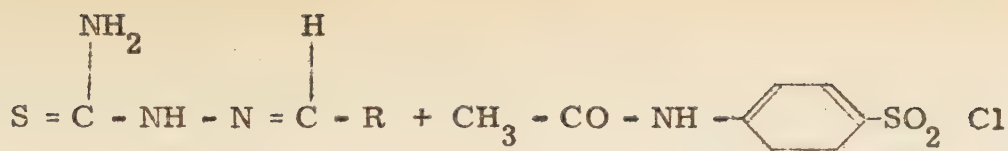
La présence de soufre dans la molécule des sulfamides a conduit les chercheurs à examiner les activités antimicrobiennes éventuelles d'autres composés organiques contenant cet élément. Ainsi, furent examinés tour à tour, les diphénylmonosulfures et les diphénylsulfures puis des diphénylsulfones.

L'un de ces sulfones, la 4, 4' di(p-amino)phénylsulfone appelée souvent sulfone-mère, ainsi que plusieurs de ses dérivés, moins toxiques, exercent une action tuberculostatique indéniable dans l'infection expérimentale du Cobaye. Malheureusement, la toxicité élevée de ces substances n'a guère permis leur utilisation pour le traitement de la tuberculose humaine.

2°) Thiosemicarbazones :

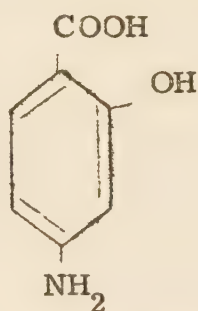
La découverte de l'activité tuberculostatique des thiosemicarbazones n'est pas la conséquence d'une recherche rationnelle portant sur la relation entre l'activité biologique et la constitution chimique, elle est accidentelle. En effet, Domagk, en recherchant les composés actifs dans la série des sulfathiodiazols, a dû, pour préparer ces substances, faire appel à des aldéhydes -thiosemicarbazones, comme montre le tableau suivant :





C'est en incorporant à la série des substances à examiner biologiquement, non seulement les thiodiazols dérivés, mais encore le produit intermédiaire, que Domagk découvrit le pouvoir tuberculostatique des thiosemicarbazones. Ses observations ont suscité de très nombreuses recherches et l'on connaît aujourd'hui un nombre considérable de corps de cette série inhibant le développement de *Mycobacterium tuberculosis* à très forte dilution in vitro. Par contre, peu d'entre eux sont actifs in vivo. De plus, ils sont très toxiques. Seule la thiosemicarbazone de l'aldéhyde p-acétylamino-benzoïque a été étudiée largement du point de vue pharmacologique et clinique.

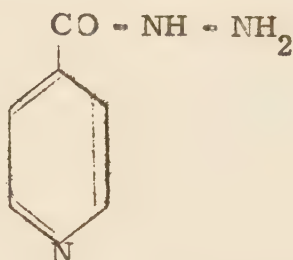
3°) Acide p-amino-salicylique :



Avant d'aboutir à la découverte de cette substance tuberculostatique, Lehman a formulé l'hypothèse suivante : rechercher des substances antagonistes de l'effet salicylique trouvé par Bernheim qui a montré que l'acide salicylique augmente la respiration de *Mycobacterium tuberculosis* en catalysant la respiration des souches virulentes. Contrai-

rement à cette hypothèse de départ, l'acide p-amino-salicylique n'entrave nullement l'effet salicylique. Nous verrons ultérieurement son mécanisme d'action.

4°) Hydrazide de l'acide iso-nicotinique :



La découverte de l'hydrazide de l'acide iso-nicotinique est encore assez accidentelle. En effet, l'existence d'une activité tuberculostatique, d'ailleurs limitée, de la nicotinamide démontrée par Chorine et Huant, et celle d'une activité de même ordre chez les thiosemicarbazones, a incité les chercheurs à préparer la thiosemicarbazone de l'aldéhyde nicotinique. Or, pour préparer cet aldéhyde, on utilise l'hydrazide de l'acide iso-nicotinique. C'est en incorporant ce dernier produit à la série des produits destinés à l'expérimentation biologique, que son activité tuberculostatique a été découverte. De très nombreux dérivés de l'isoniazide ont été synthétisés et étudiés mais aucun ne s'est montré actif, sinon moins.

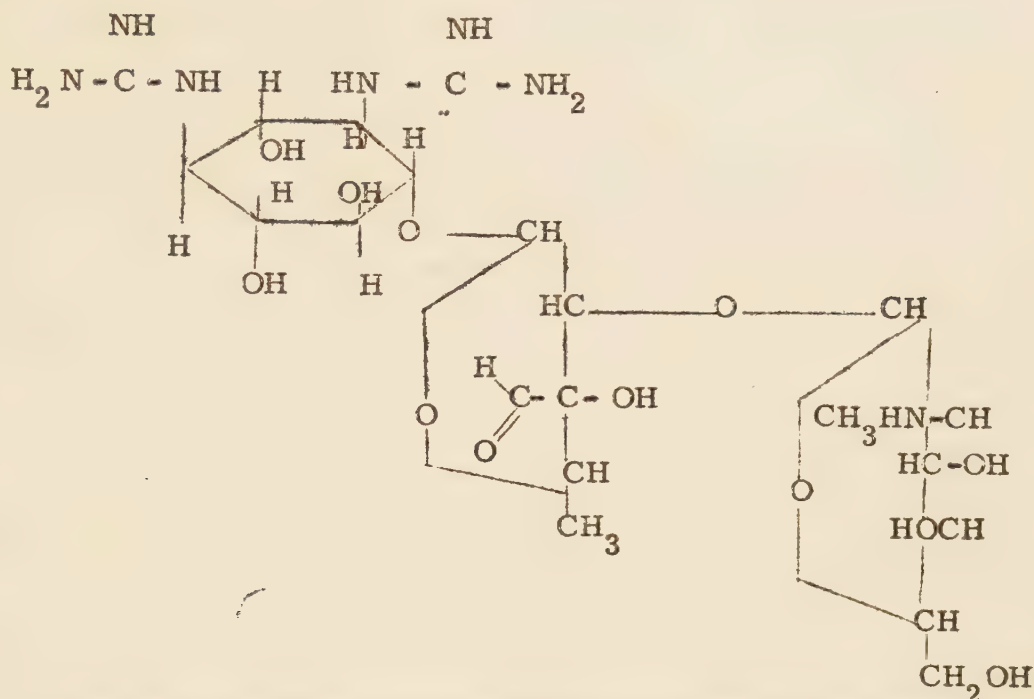
5°) Antibiotiques :

a) La streptomycine est obtenue exclusivement par voie microbiologique, très généralement à partir des cultures de *Streptomyces griseus* bien que d'autres actinomycètes produisent cet antibiotique (*S. Olivac* *S. poolensis* ou *S. bikiniensis*).

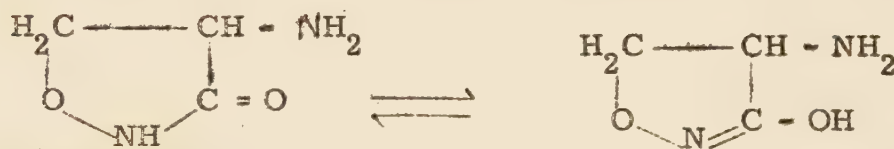
La streptomycine est formée de trois constituants : streptidine, streptose et N-méthyl-1-glucosamine constituant un disaccharide, la streptobiosamine.

La streptidine est le diguanido-1, 3 tétra-hydroxy-2,4,5,6 cyclohexane.

Streptidine et streptobiesamine, à leur tour, constituent la streptomycine.



b) La D-cyclosérine a été identifiée à la D-amino-4-isoxazolidinone-3 :



c) La Kanamycine :

Ce nouvel antibiotique isolé d'un actinomyces du sol japonais, le streptomyces kanamyceticus, par H. Umezawa en 1957 (47) (48) présente une toxicité générale et un large spectre d'activité. La kanamycine, outre l'action remarquable in vitro et in vivo sur de nombreuses souches de staphylocoques pathogènes et en particulier sur des germes résistants aux autres antibiotiques, exerce une action inhibitrice sur la croissance du bacille de Kock à la concentration de 1 ou 2 γ g/ml.

K. Yanagisawa, en collaboration avec N. Sato, O. Kanai et T. Tachibana, a montré que la kanamycine exerce un effet thérapeutique (9) comparable à celui de la streptomycine sur la tuberculose expérimentale de la Souris et du Cobaye, même pour l'infection provoquée par des germes

résistants à la streptomycine, à l'isoniazide et au P.A.S.

La kanamycine est une substance chimiquement définie dont la formule est établie par M.J. Cron (13).

C'est une base azotée s'apparentant à la streptomycine et à la néomycine par sa structure moléculaire. Aussi, ces divers antibiotiques possédant un spectre d'activité fort ressemblant, déterminent-ils des résistances croisées.

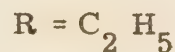
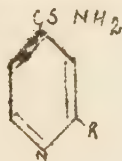
6°) Substances diverses :

Récemment, de nombreuses substances de différentes familles chimiques ont été proposées. Leur activité in vitro et in vivo est certaine mais leur mécanisme d'action n'est pas encore bien défini.

Nous citerons l'hydrazide cyanacétique (Marek, 1956; Hecht, 1957). Ce produit s'avère assez toxique sur l'homme et donne des symptômes cérébraux.

De très nombreux thiocarbanilides ont été étudiés par Eisman, Konopka, Gisi, Mizzoni et Mayer (1958).

Libermann, Rist, Grunbach et coll. (1958) ont étudié de nombreux thioamides isonicotiniques α -substitués par un radical hydrocarboné.



Dans cette série, on a trouvé le thioamide de l'acide α -éthyl isonicotinique actif sur les bacilles isoniazido-résistants (Rist, Grumbach, Libermann, 1959).

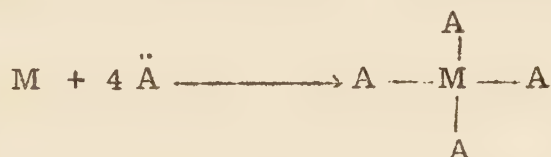
IV - MECANISME D'ACTION DES SUBSTANCES TUBERCULOSTATIQUES

CONNUES :

1°) Tentative d'explication par la théorie des complexes métalliques:

Frappés par la ressemblance de structure entre la thiosemicarbazone de l'aldéhyde p-acétaminobenzofique ou TB I et la dithizone, réactif micro-analytique classique du cuivre, Carl et Marquart, dès 1949, notèrent un parallélisme frappant entre l'activité antimicrobienne et le pouvoir complexant pour le cuivre, chez un grand nombre de tuberculostatiques connus.

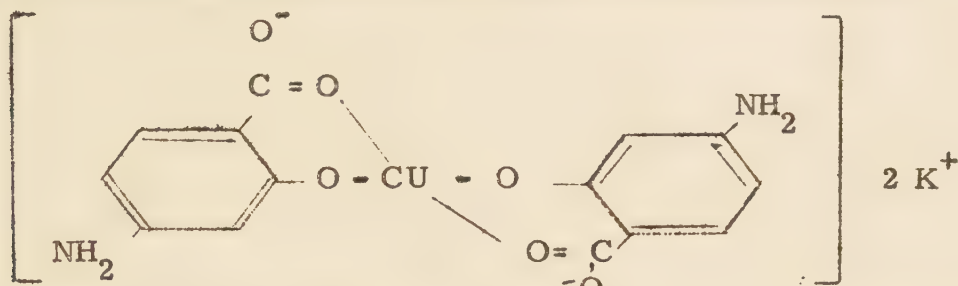
Quest-ce qu'un complexe métallique ? La perte d'un ou plusieurs électrons transforme un métal en un ion métallique. Cet ion métallique manifeste sa réactivité chimique en cherchant à récupérer les électrons perdus. Il va pouvoir s'unir avec différents donneurs d'électrons, et le produit obtenu ainsi constitue le complexe métallique :



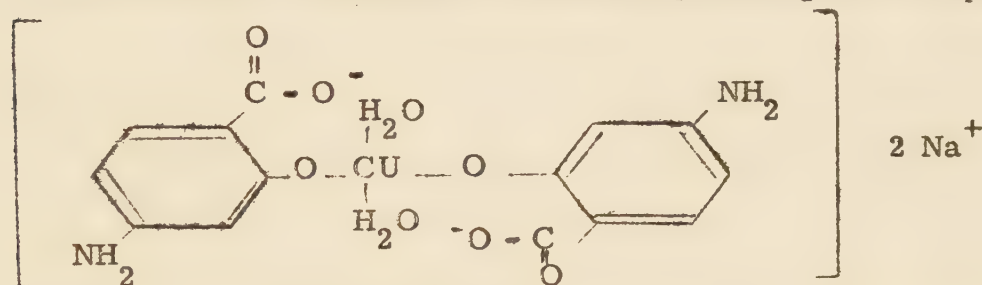
Quand la substance qui se combine avec le métal possède deux groupements donneurs d'électrons, le complexe métallique possède une structure cyclique, ce que l'on observe le plus souvent avec les tuberculostatiques. On appelle un tel complexe chélate métallique :



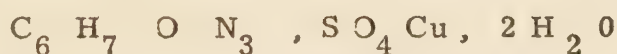
Pour l'acide p-amino-salicylique ou P.A.S., Roth, Zuber, Sorkin et Erlenmeyer (1951) pensent qu'il s'agit du complexe suivant :



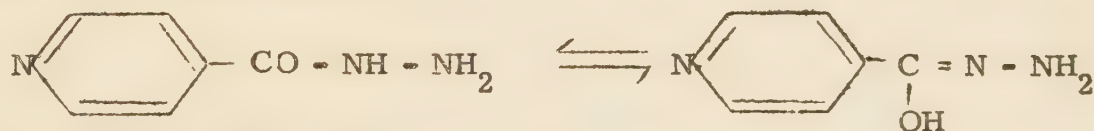
Mais Foye et Jeffrey (1955) montrent qu'il s'agit du complexe :



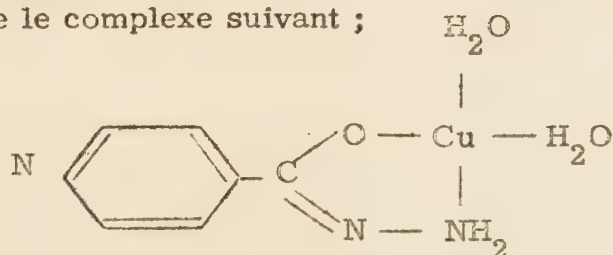
La découverte de l'action de l'hydrazide de l'acide isonicotinique fournit un nouvel exemple d'un tuberculostatique apte à donner des complexes métalliques, d'après Carl et Marquart (1952). D'autre part, Sorkin, Roth et Erlenmeyer (1952) ont montré que l'addition de sulfate de cuivre à une solution aqueuse d'isoniazide, s'accompagne de la formation rapide d'un précipité bien cristallisé de formule :



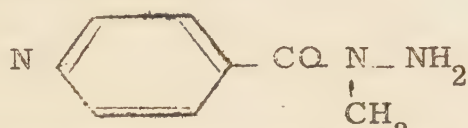
Ces auteurs pensent comme Albert (1953) que le complexe se produit grâce à la tautomérisation :



ce qui donne le complexe suivant ;

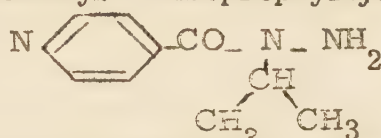


La possibilité pour l'isoniazide de donner des complexes métalliques semble, à premier abord, étroitement associée au pouvoir tuberculostatique : la N-isonicotinoyl-N-méthyl-hydrazine :



capable de subir la tautomérisation énolique et donc de donner des complexes métalliques, s'avère dénuée d'action sur le bacille tuberculeux d'après les travaux de Cymerman, Craig, Rubbo, Willis et Edgar (1955).

Mais la formation d'un complexe métallique n'est cependant pas la condition unique de l'activité tuberculostatique puisqu'une hydrazine N-disubstituée, comme la N-isonicotinoyl-N-isopropylhydrazine :



est encore active d'après Fox et Gibas (1956). D'autre part, parmi les hydrazides non substitués, l'activité tuberculostatique est étroitement liée au groupement γ -pyridyl : en effet Albert (1956) a montré que l'hydrazide picolinique, d'activité biologique huit fois inférieure à celle de l'INH, possède une affinité beaucoup plus importante pour les métaux.

Donc, la théorie des complexes métalliques, bien que simple pour l'esprit et applicable à la majorité des tuberculostatiques, n'explique pas tout le mécanisme d'une manière satisfaisante.

2°) Action des tuberculostatiques sur l'activité oxydante des ions métalliques :

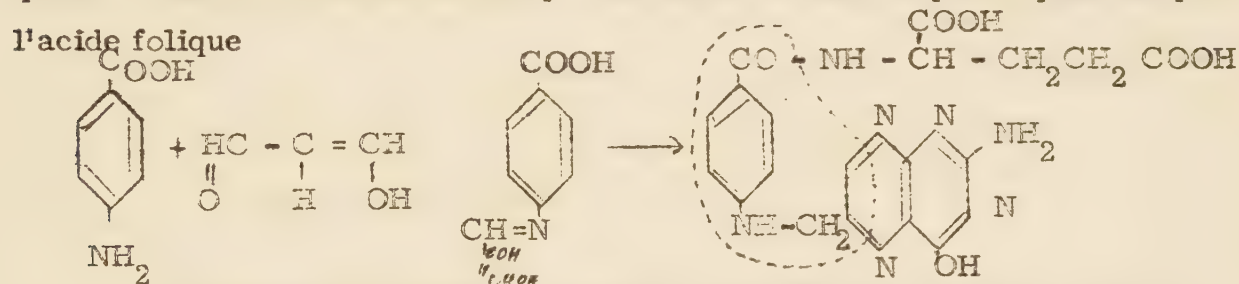
Bergel (1955) a donné une interprétation personnelle du mode d'action de divers tuberculostatiques. D'après cet auteur, le terrain tuberculeux est caractérisé par l'importance de phénomènes oxydatifs portant

sur les lipides. Par conséquent, les substances qui favorisent l'oxydation telles que les pro-oxygènes (métaux lourds, fer, cuivre, acides insaturés) ont une influence favorable sur le développement de l'infection tuberculeuse. Les tuberculostatiques agissent en général comme auto-oxydants. Ainsi, Hasselstrom, Dateo, Levinson, Stahl, Hewitt et Konigsbacher (1954) ont pu prouver que l'isoniazide manifeste vis-à-vis des lipides alimentaires un fort pouvoir anti-oxydant.

3°) Malgré les tentatives d'explication par des théories générales, le P.A.S., l'isoniazide et la streptomycine, semblent agir par un mécanisme qui leur est propre :

a) Mécanisme d'action du P.A.S. :

L'acide para-amino-salicylique agit comme antagoniste de l'acide para-amino-benzoïque, exactement comme pour les sulfamides et les sulfones. En outre, comme ces dernières substances, l'acide para-amino-salicylique se combine à la réductone, empêchant ainsi la synthèse du composé physiologique que ce triose forme normalement avec l'acide para-amino-benzoïque et qui est considéré comme un des précurseurs des acides ptéroïques tel que



Il convient de souligner la stricte spécificité d'action de l'acide p-amino-salicylique à l'égard des mycobactéries et surtout le fait que les mutants résistant à son action ne manifestent pas de résistance croisée aux substances des deux autres groupes.

b) Mécanisme d'action de la Streptomycine :

L'action de cet antibiotique semble relever plus d'une activité

antibactérienne que d'une activité spécifique.

On sait que la streptomycine change rapidement la morphologie bactérienne en se combinant par ses fonctions guanidine avec les acides nucléiques, et en particulier avec les acides ribonucléiques. Mais cette explication est insuffisante et ne montre pas une spécificité d'action, car chez les souches résistantes, pareille activité a lieu aussi.

L'hypothèse d'une action antimétabolite a été formulée à la suite de la mise en évidence d'une substance spécifiquement antagoniste de la streptomycine, le lipositol, qui possède dans sa molécule un fragment inositol-galactose.

D'autre part, l'antagonisme streptomycine-cystéine fait penser à un blocage des groupements SH des enzymes. Mais ces phénomènes ne sont pas propres aux bacilles de Koch. Ceux-ci en effet sont sensibles particulièrement aux substances qui entravent leur oxydation, d'après les travaux de Bergel. Or on a observé une inhibition par la Streptomycine de l'oxydation bactérienne avec accumulation d'acétate, en particulier l'oxydation des acides aminés. Donc, tout semble indiquer que la streptomycine agit sur le bacille tuberculeux en entravant son pouvoir oxydatif.

c) Mécanisme d'action de l'Isoniazide :

Le mécanisme d'action de l'isoniazide est le plus étudié de tous les tuberculostatiques durant les dernières années.

Nous avons vu précédemment que le mode d'action de l'isoniazide rentre dans le cadre de la théorie des complexes métalliques ainsi que celle des anti-oxydants.

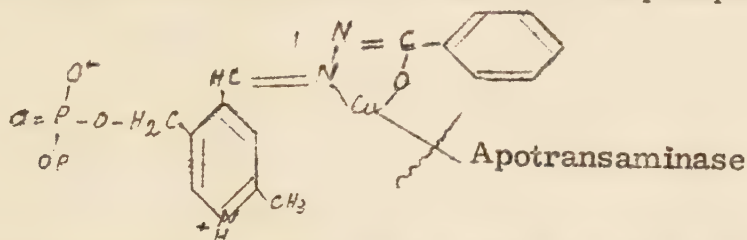
Mais les travaux récents tendent à expliquer son activité par son action spécifique sur certains enzymes.

Dans le groupe des cuproenzymes, la polyphénoloxydase s'avère fortement inhibée par de faibles concentrations, en isoniazide. Il semble que l'action inhibitrice du tuberculostatique provienne du blocage du coenzyme métallique.

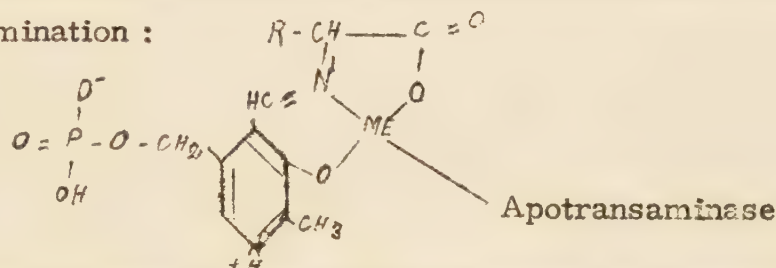
Les enzymes métallo-porphyriniques se montrent également sensibles à l'isoniazide. La catalase (enzyme contenant du fer héminique) qu'elle soit d'origine bovine ou microbienne, est inhibée par l'isoniazide mais cette inhibition devient considérable lorsque le tuberculostatique agit en présence d'ions cuivre, qui seuls n'entravent que faiblement la réaction enzymatique, d'après Maker, Speyer et Levine (1957). Ces auteurs proposent une nouvelle hypothèse : l'INH agit par son complexe métallique en compétition pour la possession de certains "sites" de la molécule de catalase, avec l'eau oxygénée formée au cours du métabolisme microbien. La catalase inactivée ne permettrait plus la destruction de l'eau oxygénée dont l'accumulation est nocive pour la mycobactérie. Mais d'un autre côté, certaines souches de bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide, comme l'ont montré Middlebrook et coll. (1954) sont habituellement dépourvues de catalase. Ce manque de catalase entraîne une accumulation d'eau oxygénée qui pourrait alors réaliser la destruction intracellulaire de l'isoniazide, d'où l'explication du phénomène de la résistance à l'isoniazide.

Enfin, nous dirons que les facteurs vitaminiques B₆ entrent dans la constitution de nombreux enzymes participant au métabolisme protéidique. Il est établi par les travaux de Boone, Turney et Langham (1955) de Rosen (1955) de Carlson, Anthony, Russel et Middlebrook (1956) qu'il existe un antagonisme entre les vitamines B₆ et l'isoniazide chez l'animal et chez

l'homme. Mauron (1955) a montré que le complexe cuprique de l'INH possède une activité inhibitrice 65 fois plus grande que celle de l'isoniazide seul sur la glutamino-alanino-amino-phérase hépatique. Pour Mauron et Bujard (1956) l'INH en formant le chélate suivant avec le phosphate de pyridoxal:



prend la place de l'acide aminé dans le chélate actif nécessaire à la réalisation de la transamination :



Récemment, Krüger-Thiemer (1957) a proposé une hypothèse nouvelle sur le mécanisme d'action de l'Isoniazide. Selon cet auteur, l'isoniazide, après avoir pénétré dans le bacille, y serait transformé en acide isonicotinique par un oxydase qui n'existe que dans les bacilles tuberculeux isoniazido-sensibles. L'acide isonicotinique entrerait alors en compétition avec le nicotinamide pour former un analogue encore hypothétique du coenzyme I inactif. En l'absence de coenzyme I actif, l'oxydation de l'hydrogène actif serait opérée par les flavines, ce qui occasionne l'accumulation d'eau oxygénée toxique.

V - ETUDES FAITES DANS LE PRESENT TRAVAIL

Au point de vue théorique, nous voulons dans ce travail d'une part apporter de nouveaux arguments en faveur de la théorie des complexes métalliques en étudiant le thiocarbohydrazide qui est un chélateur par excellence étant données ses nombreuses propriétés analytiques que nous

avons étudiées, et d'autre part étudier l'influence du terrain sur l'évolution de la tuberculose en utilisant des substances fortement réductrices et dénuées par elles-mêmes d'activités pharmacodynamiques, telles que la réductone, la rongalite ou le thiocarbohydrazide lui-même.

L'étude spéciale de dérivés méthylène-sulfoxyrate de sodium de l'isoniazide et de l'acide para-amino-salicylique porteurs de groupements fortement réducteurs, nous montre que ces substances sont beaucoup moins toxiques que l'isoniazide et l'acide para-amino-salicylique eux-mêmes. L'étude de toxicité a été faite à la fois sur l'animal et en pharmacologie cellulaire. Quant à l'étude du mécanisme d'action de ces substances, elle permet de voir leurs différences d'activités par rapport à l'isoniazide et à l'acide para-amino-salicylique tout en donnant une meilleure explication du mécanisme d'action de ces derniers.

Au cours de ce travail, nous utilisons de nouvelles techniques d'étude en pharmacologie, celles de pharmacologie cellulaire, qui sont appelées à devenir de plus en plus intéressantes car la pharmacologie cellulaire permet d'analyser l'action des substances pharmacologiques au niveau des cellules elles-mêmes.

DEUXIEME PARTIE

===== .

SYNTHESE CHIMIQUE

PLAN DE LA DEUXIEME PARTIE

- I - SYNTHÈSE DU THIOCARBOHYDRAZIDE
- II - SYNTHÈSE DE DEUX DÉRIVÉS DU MÉTHYLENE SULFOXYLATE DE SODIUM
- III - SYNTHÈSE DE LA TRIOSE-REDUCTONE

I - SYNTHESE DU THIOCARBOHYDRAZIDE

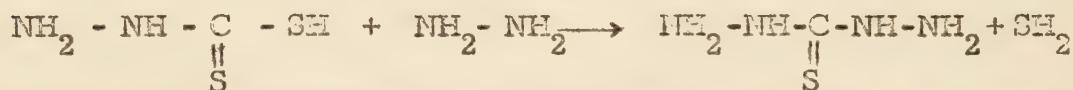
Nous avons préparé le thiocarbohydrazide par la technique décrite par Stollé et Bowles (46). Cette préparation simple consiste à condenser une molécule de sulfure de carbone avec deux molécules d'hydroxyde d'hydrazinium.

Technique opératoire :

Dans un ballon à 3 tubulures muni d'une ampoule à brome et d'un réfrigérant ascendant, on introduit goutte à goutte et en agitant 20 g. d'hydrate d'hydrazine dans 38 g. de sulfure de carbone. Il se fait alors la réaction :



L'addition subséquente de 20 g d'hydrate d'hydrazine donne la réaction :



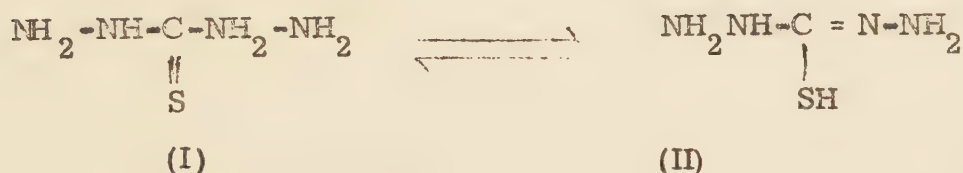
Le thiocarbohydrazide obtenu est purifié par recristallisation dans l'eau. Le rendement est de 80% en aiguilles prismatiques incolores, mais devenant légèrement roses au contact de l'air et de la lumière, se décomposant vers 168° comme l'indique la littérature, et ayant un poids moléculaire égal à 108.

On a mentionné des méthodes de préparations (4) (27) soit à partir du xanthogénate d'éthyle, soit à partir du thiophosgène. Mais celle proposée par Stollé et Bowles en 1908 nous paraît la plus simple et se réalise avec des matières premières facilement accessibles telles que le sulfure de carbone et l'hydrate d'hydrazine à 98%. C'est la raison pour laquelle nous avons adopté cette dernière méthode pour la préparation du thiocarbohydrazide.

Le principe de cette réaction peut se résumer de la manière suivante :

Une molécule d'hydrazine se combine à une molécule de sulfure de

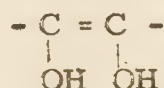
carbone pour donner une molécule d'acide amino-di-thiocarbazique. Celui-ci en réagissant sur un deuxième molécule d'hydrazine donne enfin une molécule de thiocarbohydrazide avec départ d'hydrogène sulfuré. Le thiocarbohydrazide qui peut être représenté par les deux formules tautomètres I et II suivantes :



se prête aux applications analytiques au moins par son pouvoir chélateur.

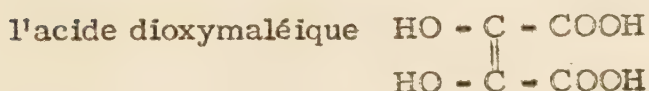
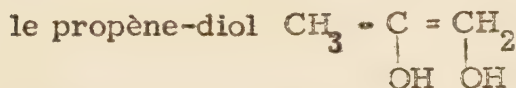
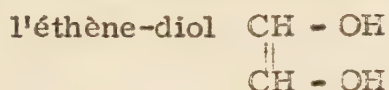
II - SYNTHESE DE LA TRIOSE-REDUCTONE

Le terme "réductone" est réservé à une famille de substances qui possèdent un groupement ène-diol (20) :



et qui présente un grand pouvoir réducteur. Ainsi on connaît d'après la classification d'Euler :

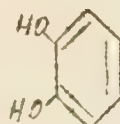
A) des réductones aliphatiques telles que :



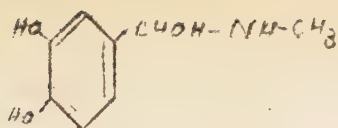
etc...

B) des réductones aromatiques telles que :

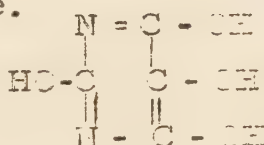
la pyrocatechine :



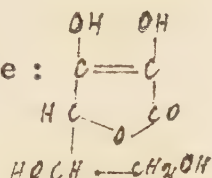
l'adrénaline :



C) des réductones hétérocycliques telles que l'acide dialurique qui est un produit de réduction de l'alloxane.



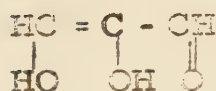
et l'acide ascorbique :



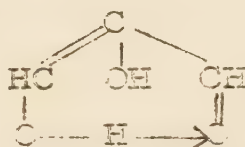
Les réductones constituent des produits importants tant dans l'industrie pharmaceutique que dans le métabolisme cellulaire.

La triose-réductone, appelée couramment réductone (réductose sous une forme impure) est une matière première de la synthèse des ptérines, en particulier la synthèse de l'acide folique et de la vitamine B₁₂.

Euler et Martius (19) ont proposé les formules suivantes :



(I)



(II)

Préparation de la triose-réductone :

50 g de glucose sont dissous dans 2,5 litres d'eau distillée et chauffés à 90°C. sous un courant d'azote. L'N est débarassé de son oxygène comme impureté par barbotage dans une solution de pyrogallol sodique à 1%. On ajoute ensuite 27 gr d'acétate de plomb liquide, 17 gr de Na OH, et quelques milligrammes de CNK dissous dans 50 ml d'eau. La réaction doit durer très exactement 2'30", à la température de 90-92°C. On neutralise par 40 ml d'acide acétique 4 N, ce qui fait précipiter le sel de plomb. Ensuite, toujours sous un courant d'azote, on refroidit rapidement. Le sel de plomb,

recueilli par filtration , est lavé avec du méthanol et de l'éther. Après séchage sous vide sulfurique, on obtient environ 15 gr de sel de plomb roux, qui, après titrage par l'iode, doit correspondre à 3 gr de réductone impure.

On met le sel de plomb , finement pulvérisé, en suspension dans l'acétone. On précipite le plomb par barbotage de l'hydrogène sulfuré. La réductone libérée est soluble dans l'acétone. On filtre, et on évapore la solution jaune obtenue sous vide.

La recristallisation de l'eau chaude donne des cristaux en aiguilles brillantes, d'une odeur suave, se décomposant vers 200-220° après brunissement entre 150 et 170°C.

Formule brute $C_3 H_4 O_3 = 88$

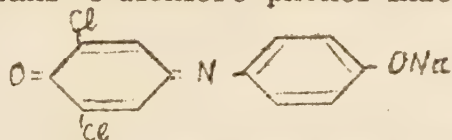
C = 54,54 %

H = 4,53 %

Le rendement est très faible, de l'ordre de 5%.

La réductone est soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone; très soluble dans l'ester acétique et l'éther; insoluble dans l'éther de pétrole et le benzène.

La réductone réduit le $NO_3 Ag$ en solution acide et à froid. Le réactif de Tillmans o dichloro-phénol-indophénol :



est utilisé pour le dosage de toutes les réductones .

III - SYNTHÈSE DE NOUVEAUX DÉRIVÉS DU MÉTHYLENE SULFOXYLATE DE SODIUM

Les dérivés du méthylène-sulfoxyate de sodium ont pour formule générale :



dans laquelle $R - NH -$ est le reste d'un dérivé aminique $R - NH_2$ ayant des propriétés tuberculeuses ou anti-lépreuses.

Comme nous avons montré que la rongalite ou formaldéhyde de sodium $HOCH_2 - SO_2Na$ inhibe la croissance du bacille de Koch à la concentration de 10^{-3} par suite de son pouvoir réducteur (voir 3ème partie : étude biologique).

Cette activité du formaldéhyde sulfoxyate de sodium, bien que insuffisante par elle-même, pourrait être mise à profit, selon notre hypothèse de travail, en combinant ce composé avec des dérivés aminiques $R-NH_2$ présentant déjà par eux-mêmes des propriétés antituberculeuses, ou anti-lépreuses.

Cette combinaison aboutit aux composés (1) suivant la réaction :

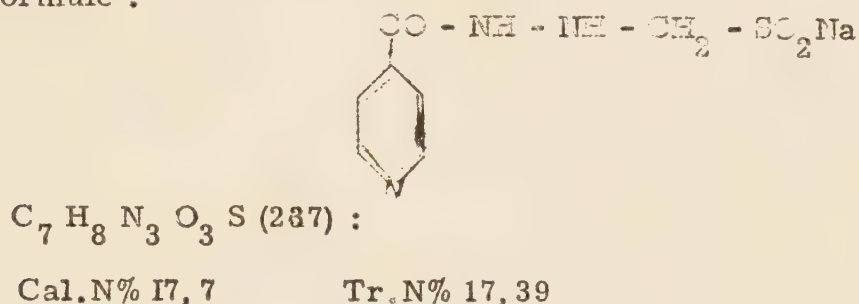


Ces composés nouveaux possédant un atome de soufre et un pouvoir réducteur, seront étudiés au point de vue biologique.

1) Préparation du sel monosodique de (N-méthylène-sulfoxylate) -isonicotinoylhydrazide :

A 13,7 g d'hydrazide de l'acide isonicotinique dissous dans de l'éthanol absolu, on ajoute une solution aqueuse de 12,0 g de formaldéhyde sulfoxyate de sodium.

Le mélange est chauffé à reflux pendant 1 heure. On chasse l'excès de solvant sous vide. On précipite par l'acétone. La recristallisation de l'éthanol donne des micro-cristaux jaunâtres se décomposant à 245° C. Ils répondent à la formule :



2) Préparation du sel disodique de l'acide (N-méthylène-sulfoxyate) - amino-4 hydroxy-2 benzoïque :

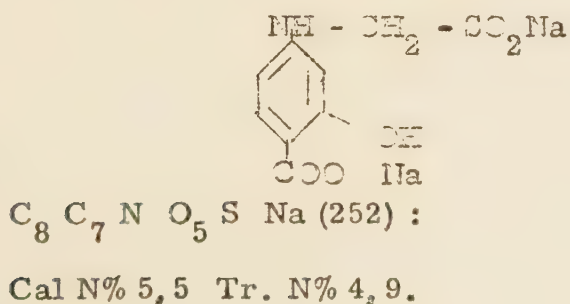
A 15, 3 g de sel de sodium de l'acide p-aminosalicylique dissous dans l'éthanol à 95°, on ajoute 12,0 g de formaldéhyde sulfoxyate de sodium dissous dans un minimum d'eau.

Le mélange est chauffé à reflux pendant 1 heure.

On chasse l'excès de solvant sous vide. On ajoute de l'acétone pour faciliter la précipitation.

La recristallisation dans de l'éthanol donne des microcristaux jaunâtres se décomposant à 314°C.

La formule de composé obtenu est la suivante :



TROISIEME PARTIE
=====

ETUDE ANALYTIQUE

PLAN DE LA TROISIEME PARTIE

I - ETUDE ANALYTIQUE DU THIOCARBOHYDRAZIDE

II - ETUDE POTENTIOMETRIQUE DU CHELATE CUPRIQUE
DU THIOCARBOHYDRAZIDE.

I - ETUDE ANALYTIQUE DU THIOCARBOHYDRAZIDE :

Nous avons effectué des essais à la touche avec divers cations et anions des différents groupes. Ces essais ont été effectués sur plaquettes ou en microtubes de centrifugeuse (17).

1) Essais qualitatifs avec les cations :

- a) Groupe des métaux alcalins : aucune réaction apparente.
- b) Groupe des alcalino-terreux : aucune réaction apparente.
- c) Groupe de l'ammoniaque :

- réaction positive avec :

Fe^{++} (sulfate ferreux) : précipité violet.
 Fe^{+++} (chlorure ferrique) : précipité brun.
 U^{IV} (sulfate d'Uranium IV) : précipité blanc.
 U^{VI} (nitrate d'uranium VI) : précipité rouge.
 Ti^{IV} (chlorure de titane IV) : précipité jaunâtre.
 Ce^{IV} (nitrate cérique) : précipité blanc en milieu acide.
 Zr^{IV} (nitrate de zirconium) : précipité grisâtre.
 Th^{IV} (nitrate de thorium) : précipité blanc.

- réaction négative avec :

Al^{+++} (nitrate d'aluminium)
 Cr^{+++} (chlorure de chrome)
 Ce^{+++} (nitrate céreux)
Terres rares.
 Ga^{+++} et In^{+++}
 Be^{++} (carbonate de béryllium)

d) Groupe de Zinc :

- réaction positive avec :

Ni^{++} (sulfate de nickel) : précipité chocolat clair.

Co^{++} (chlorure de cobalt): précipité rose orangé.
 Zn^{++} (acétate de zinc) : précipité blanc.
 Cd^{++} (acétate de cadmium): précipité blanc.
 Cu^{++} (sulfate cuivrique) : précipité vert grisâtre).
 Mn^{++} (chlorure ou sulfate de manganèse): formation d'un complexe soluble.

e) Groupe Plomb-Bismuth-Mercure :

- réactions positives avec :

Pb^{++} (acétate de plomb) : précipité jaune citron.
 Bi^{++} (nitrate de bismuth): précipité orangé.
 Hg^{+} (nitrate mercurieux) : précipité gris.
 Hg^{++} (chlorure mercurique) : précipité blanc.

f) Eléments à chlorures peu solubles :

- réactions positives avec :

Ag^{+} (nitrate d'argent) : précipité jaune.
 Tl^{+++} (nitrate de thallium): précipité blanc jaunâtre).

g) Métaux précieux :

- réactions positives avec :

Pd^{++} (chlorure de palladium) : précipité blanchâtre
 Ru^{+++} (rouge de ruthénium $2 \text{Ru}(\text{OH})\text{Cl}_2, 7 \text{NH}_3$): coloration rouge. Réaction déjà étudiée par Steiger).
 Pt^{IV} (acide platichlorhydrique) : précipité chamois.

- réactions négatives avec :

Au^{+++} (chlorure d'or).

h) Groupe de l'arsenic :

- réactions positives avec :

Mo^{+++} (sulfure de molybdène): coloration rose

Mo^{IV} (molybdate d'ammonium): précipité marron foncé.
 As^{+++} (arsénite de sodium) : précipité blanc.
 As^{V} (arséniate de sodium): précipité blanc.
 Sb^{V} (antimoniate de potassium): précipité blanc.
 V^{V} (vanadate de sodium): coloration violette.
 V^{IV} (sulfate de vanadyle): réaction avec virage du bleu au jaune.

- réactions négatives avec :

W^{VI} (tungstate de sodium)
 Sn^{++} (oxalate d'étain).

2) Essais qualitatifs avec quelques anions.

a) Nous avons obtenu des réactions positives avec :

- phosphomolybdate d'ammonium : précipité chocolat.
- bichromate de potassium : précipité gris.
- sélénite de potassium : précipité couleur de pêche (Se).
- tellurite de potassium : précipité noir (Te).
- tellurate de potassium: précipité noir (Te).
- chlorure de cobaltamine : réaction avec virage du pourpre au jaune.

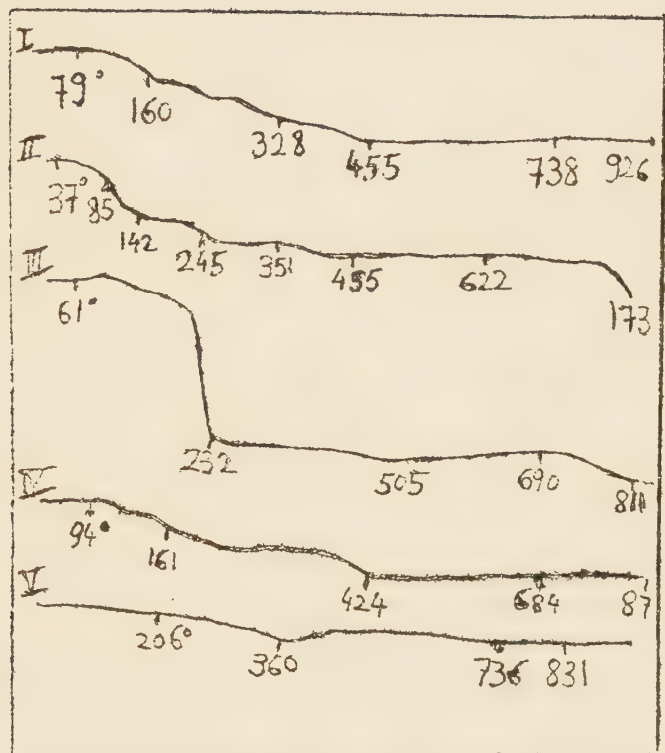
b) Les anions suivants ont donné des réactions négatives :

- hyposulfite de sodium
- ferrocyanure de potassium.
- ferricyanure de potassium.
- phosphate d'ammonium.
- halogénure d'ammonium.
- acide sulfanilique
- sulfocyanure de sodium.

- persulfate d'ammonium
- nitrate de sodium.
- tantaliclorure de potassium.

Comme nous l'avons vu, le thiocarbohydrazide donne des réactions diversement colorées avec nombreux cations et anions. Les précipités quand ils se forment sont stables à la chaleur et les précipitations sont totales. Ainsi le thiocarbohydrazide se prête à des dosages gravimétriques aussi bien qu'à des dosages colorimétriques.

Les courbes de thermolyse (10) faite à l'aide de la thermobalance de Chevenard au laboratoire de M. le Professeur DUVAL donnant avec les précipités de molybdate d'ammonium; de nitrate de bismuth et de sulfate de cuivre par le thiocarbohydrazide les résultats suivants :



Courbes de thermolyse des précipités

- I. Nitrate d'Uranium par Thiocarbohydrazide.
- II. Molybdate d'ammonium par Thiocarbohydrazide.
- III. Nitrate de Nickel par Thiocarbohydrazide.
- IV. Nitrate de Bismuth par Thiocarbohydrazide.
- V. Sulfate de Cuivre par Thiocarbohydrazide.

Essais en analyse organique fonctionnelle :

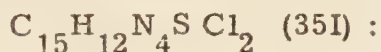
Le thiocarbohydrazide est un réactif des aldéhydes en donnant des hydrazones vivement colorées en jaune ou en rouge. Ces thiocarbohydrazones ont pour formule générale :



Les points de fusion ne sont pas toujours nets, car les produits se décomposent avant de fondre. Mais les précipitations sont complètes; les précipités se lavent et se filtrent très bien. C'est pourquoi, nous les proposons pour l'analyse gravimétrique des aldéhydes.

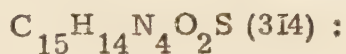
Voici quelques exemples de thiocarbohydrazones nouvelles :

Thiocarbohydrazone de l'aldéhyde p-chlorobenzoiïque. Cristallise en aiguilles soyeuses jaune pâle (de l'éthanol), F = 216°



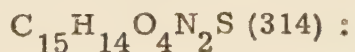
Cal. N% 15,9 Tr. N% 15,6

Thiocarbohydrazone de l'aldéhyde silylique. Aiguilles soyeuses jaunâtre F = 227° (de l'éthanol)



Cal. N% 17,8 Tr. N% 17,9

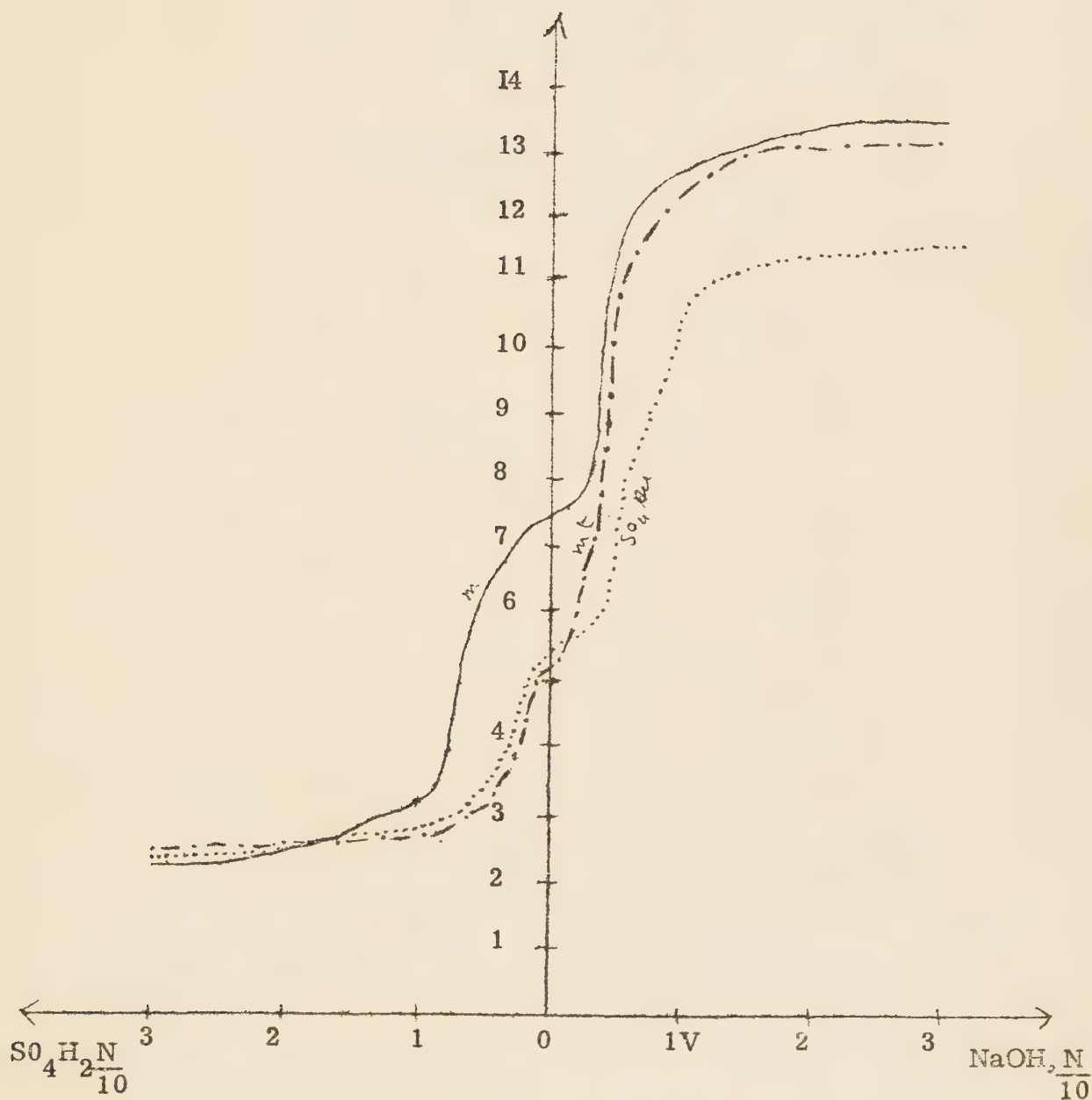
Thiocarbohydrazone de l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque. Aiguilles jaune pâle F = 292° (décompos. de l'éthanol)



Cal. N% 17,8 Tr. N% 17,5.

II - ETUDE POTENTIOMETRIQUE DU CHELATE CUPRIQUE DU THIO- CARBOHYDRAZIDE

Nous observons que la coloration bleue d'une solution aqueuse diluée de sulfate de cuivre fait place à une coloration verte, lorsque nous y versons une solution aqueuse de thiocarbohydrazide. Cette modification de coloration signifie à elle seule la formation d'un complexe métallique. Elle s'accompagne d'un important abaissement de pH. La solution de sulfate de cuivre de pH= 5,3 passe en effet à pH= 5 par adjonction du thiocarbohydrazide, alors que la solution aqueuse de celui-ci présente un pH de 7,3. La baisse du pH provient de la libération d'ions H^+ par le thiocarbohydrazide, l'hydrogène étant remplacé par le métal. C'est la deuxième preuve de la formation du complexe. La titration potentiométrique de nos diverses solutions fournit les courbes représentées sur la figure. La courbe mt qui n'est pas la somme des courbes m et t correspond donc au nouveau composé formé.



Titration potentiométrique du chélate cuprique du Thiocarbonylhydrazide

QUATRIEME PARTIE

=====

ESSAIS BIOLOGIQUES

PLAN DE LA QUATRIEME PARTIE

I - ETUDE DU ROLE DES REDUCTEURS SUR MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS, IN VITRO ET IN VIVO

II- ETUDE DE L'ACTIVITE TUBERCULOSTATIQUE IN VITRO
ET IN VIVO DE DEUX DERIVES DU METHYLENE-SULFOXY-
LATE DE SODIUM :

1 - Etude du sel monosodique de (N-méthylène-sulfoxyate)-
isonicotinoylhydrazide.

2 - Etude du sel disodique de l'acide (N-méthylène-sulfoxyate)-
amino-4 hydroxy-2 benzoïque.

I - ETUDE DU ROLE DES REDUCTEURS SUR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN VITRO et IN VIVO :

Le bacille tuberculeux est un germe aérobie strict, incapable de proliférer en anaérobiose. Novy et Soule ont pu écrire : "La grande sensibilité du bacille de Koch à la privation d'oxygène pourrait , au moins partiellement, expliquer l'arrêt du développement bacillaire à l'intérieur des formations cellulaires compactes constituant le tissu tuberculeux".

M. Polonovski (38) signale comme admis que la consommation d'oxygène absolue tend à s'élever chez les tuberculeux. Or, les médicaments actifs dans différentes formes de tuberculose ont tous un pouvoir réducteur marqué : acide para-aminosalicylique, streptomycine, hydrazide de l'acide isonicotinique, dérivé du salicylhydrazide et de la thiosemacarbazone, etc... Bergel (1955), comme nous avons vu dans un précédent chapitre , a remarqué que le terrain tuberculeux est caractérisé par l'oxydation cellulaire importante portant sur les lipides et que les tuberculostatiques agissent comme antioxydants.

Dans le présent travail, nous avons cherché si les substances réductrices telles que la formaldéhyde sulfoxylate de sodium ou rongalite, et l'aldéhyde diénol-1, 2 tartronique ou réductone, substances remarquables par leur pouvoir réducteur, utilisé même en industrie chimique, possèdent d'elle-mêmes une activité tuberculostatique in vitro et in vivo.

1°) Etude in vitro :

Nos essais ont porté tout d'abord sur l'acide ascorbique J. Bretey (7) a déjà signalé en 1940 le rôle joué par les variations de l'ascorbémie sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du Cobaye, mais sans faire de relation avec l'effet direct de cette vitamine sur le bacille de Koch.

Le deuxième produit que nous avons essayé est le formaldéhyde sulfoxylate de sodium ou rongalite, utilisé en chimie organique pour sa puissante action réductrice. La troisième substance étudiée *in vitro* est la réductone ou aldéhyde diénol-1,2 tartronique, étudiée par Wurmser (52) et synthétisée en particulier par Von Euler et Martius (19). On sait que la réductone est utilisée sous une forme non purifiée appelée réductose dans les cultures en anaérobiose pour son pouvoir réducteur.

Matériel et méthodes :

Ces produits ont été mis en solution dans l'eau distillée et stérilisée par tyndalisation. Des quantités croissantes de ces solutions ont été réparties aseptiquement dans des tubes contenant soit du milieu de Sauton (additionné d'un vingtième de sérum de cheval filtré), soit du milieu de Dubos (au tween 80 et avec albumine) pour réaliser des concentrations finales allant de 10^{-2} à 10^{-6} . Tous ces tubes ont été ensemencés avec une suspension de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇RV, provenant d'une culture faite dans le milieu correspondant de 15 jours pour le milieu de Sauton, de 6 jours pour le milieu de Dubos. Le pH des milieux après addition de la rongalite n'a pas varié. Après addition d'acide ascorbique ou de réductone, le pH du milieu de Sauton est passé à 6,3 tandis que celui du milieu de Dubos plus tamponné était de 6,9. Nous avons opéré de même pour le Thio-carbohydrazide, autre substance réductrice.

Résultats :

Pour des concentrations égales ou supérieures à 10^{-3} , nous n'avons obtenu aucun développement du bacille tuberculeux. Les tubes avaient été laissés dans l'étuve à 37° C pendant un mois en position inclinée pour que le liquide ait cependant une surface de contact avec l'air. Quant au Thio-carbohydrazide il est actif, dans les mêmes conditions, à la concentration de 10^{-5} .

Conclusions :

Les réducteurs tels que l'acide ascorbique, le formaldéhyde sulfoxylate de sodium ou la réductone employés à des concentrations de l'ordre de 10^{-3} entravent le développement de *Mycobacterium tuberculosis*.

2°) Etude in vivo :

Nous avons étudié l'effet de la rongalite sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du Cobaye.

Nous avons utilisé trois lots comportant chacun six Cobayes. Tous les dix huit Cobayes, ayant un poids moyen voisin de quatre cents grammes, ont été inoculés avec une suspension en eau physiologique de bacille de Koch, souche H₃₇RV.

- a) Le premier lot est laissé sans traitement;
- b) Le deuxième lot est traité journellement, dès le lendemain de l'inoculation, par l'isoniazide à raison de 2 mg par Cobaye.
- b) Le troisième lot est traité dans les mêmes conditions par le formaldéhyde sulfoxylate de sodium à raison de 150 mg par Cobaye.

Dès le 9ème jour, les six cobayes du lot témoin présentent nettement des ganglions inguinaux du côté inoculé. Quant aux Cobayes des lots traités par l'isoniazide et la rongalite, il n'y a aucun signe de réaction ganglionnaire.

C'est à partir du 20ème jour que deux Cobayes sur six du lot traité par la rongalite, commencent à avoir une réaction ganglionnaire.

Au 30ème jour, quatre sur six des cobayes traités par la rongalite ont des ganglions, qui restent cependant beaucoup moins volumineux

que ceux des témoins. Deux sur six du même lot restent indemnes.

Au 40ème jour, nous avons observé le même aspect qu'au 30ème jour, à savoir :

- lot témoin : tous les six ont d'énormes ganglions dont cinq laissent écouler du pus;

- lot traité par l'isoniazide : aucun ne présente de ganglions palpables;

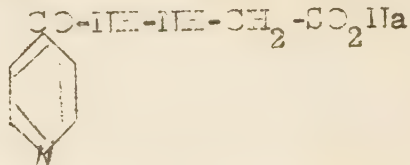
- lot traité par la rongalite : quatre Cobayes sur six seulement présentent des ganglions tandis que les deux derniers semblent indemnes.

Conclusions :

Cette expérience montre que la rongalite par son effet fortement réducteur a pu uniquement retarder sensiblement l'évolution de la tuberculose expérimentale du Cobaye.

II - ETUDE DE L'ACTIVITE TUBERCULOSTATIQUE IN VITRO ET IN VIVO DE DEUX DERIVES DU METHYLENE-SULFOXYLATE DE SODIUM :

1°) Etude du sel monosodique de (N-méthylène-sulfoxyrate)-isonicotinoyl- hydrazide :



A) Résultats des essais in vitro :

L'activité in vitro de l'I N H et celle de son dérivé sont sensiblement égales, dans les mêmes conditions de culture, si l'on évalue en poids de l'I N H.

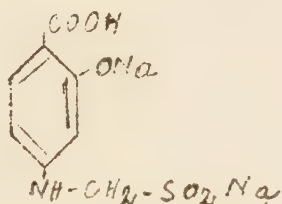
E) Résultats des essais de toxicité aigue préliminaire :

La dose L_{50} du dérivé méthylène-sulfoxyate de l'I N H est de 750 mg par Kg de Souris et la dose L_{100} du même dérivé est de 1.300 mg. Nous verrons dans la sixième partie, les résultats de l'étude comparative de ce dérivé avec l'I N H lui-même et le dérivé méthylène sulfoxyate de l'I N H .

C) Résultats des essais in vivo :

Le dérivé méthylène-sulfoxyate de l'I N H arrête complètement l'évolution de la tuberculose du Cobaye au même titre que l'I N H et nous avons observé d'autre part que les animaux traités ont supporté sans aucun incident apparent l'administration de doses élevées allant jusqu'à 200 mg par kilo et par jour pendant une période de 45 jours.

2°) Etude du sel disodique de l'acide (N-méthylène-sulfoxyate)-amino-4 hydroxy-2-benzoïque :



A) Résultats des essais in vitro :

L'activité in vitro du P.A.S. reste sensiblement égale à celle de son dérivé méthylène-sulfoxyate de sodium sur les souches de Mycobacterium tuberculosis résistants ou sensibles au P.A.S. que nous avons utilisées, en milieu de Sauton additionné de sérum.

B) Résultats des essais de toxicité :

La toxicité du P.A.S. est sensiblement égale à celle de son dérivé. La dose L_{50} pour ces deux produits se situe à 4,5 g par kilo de Souris. Mais étant donnée la faible toxicité aigue du P.A.S. la modification de la formule

n'influe pas d'une manière sensible sur elle. Par contre, lors des essais in vivo, le dérivé méthylène-sulfoxyate du P.A.S. est parfaitement toléré pendant 3 mois par les Cobayes, alors que ceux traités par le P.A.S. sont morts avant un mois .

C) Résultats des essais in vivo :

Nous avons noté que l'activité du P.A.S. est sensiblement égale à celle de son dérivé méthylène-sulfoxyate de sodium. Toutefois, celui-ci est nettement mieux toléré au cours du traitement que le P.A.S. lui-même.

CINQUIEME PARTIE

=====

ETUDE COMPARATIVE DE TOXICITE DE L'INH ET DE
SES DERIVES METHYLENE-SULFOXYLATE ET METHYLENE SULFONATE

PLAN DE LA CINQUIEME PARTIE

- I - ETUDE COMPARATIVE DE TOXICITE AIGUE CHEZ LES SOURIS
- II - ETUDE COMPARATIVE DE TOXICITE SUR LES CELLULES
DE REIN DE BOVIDE, EN CULTURE.
- III - ETUDE COMPARATIVE DE TOXICITE S ANGUINE.

On sait que l'utilisation en thérapeutique de l'INH est limitée à une dose inférieure à 15 mg par jour, car des doses supérieures causent des troubles nerveux. Aussi, recherche-t-on des dérivés d'INH qui soient moins toxiques que l'INH tout en possédant une activité tuberculostatique similaire. Jusqu'ici toutes les tentatives d'obtenir un tel dérivé ont échoué. En effet, si la toxicité est notablement diminuée, les dérivés d'INH s'hydrolyse immédiatement dans l'organisme pour donner l'INH qui agit. Seul le sel sodique de (N-méthylène-sulfoxylate)-isonicotinoylhydrazide, spécialisé au Japon sous le nom de Néo-iscotin, semble avoir le même mécanisme d'action que le sel sodique de (N-méthylène-sulfoxylate)-isonicotinoyldrazide que nous étudions dans ce travail. C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant de comparer la toxicité de ces deux produits avec celle de l'INH.

I - ETUDE COMPARATIVE DE TOXICITE AIGUE DE L'INH DU SEL SODIQUE
de H-(méthylène-sulfoxylate)-isonicotinoylhydrazide et du sel sodique de
N-(méthylène-sulfonate)-isonicotinoylhydrazide chez les Souris.

Les essais de toxicité aigue ont été effectués pour chaque dose sur un lot de 10 Souris de 30 grammes environ. Les survies des Souris auxquelles nous avons administré par voie intrapéritonéale des doses croissantes d'INH, du sel sodique de N-(méthylène-sulfoxylate)-isonicotinoylhydrazide et du sel sodique de N-(méthylène-sulfonate)-isonicotinoylhydrazide, sont résumées dans le tableau I.

Nous avons établi la dose léthale 50 par deux méthodes différentes.

La première méthode consiste à construire une courbe de mortalité en portant en abscisse la dose administrée et en ordonnée le pourcentage d'animaux tués. On obtient une courbe en S. La dose léthale 50 est celle qui tue 50% des animaux.

Nous avons obtenu :

a) pour l'I N H :

DL 50 = 0,160 g/kg

b) pour le sel sodique de N-(méthylène-sulfoxyate)-isonicotinoylhydrazide:

DL 50 = 1,800 g/kg

c) pour le sel sodique de N-(méthylène-sulfonate)-isonicotinoylhydrazide:

DL 50 = 1,000 g/kg

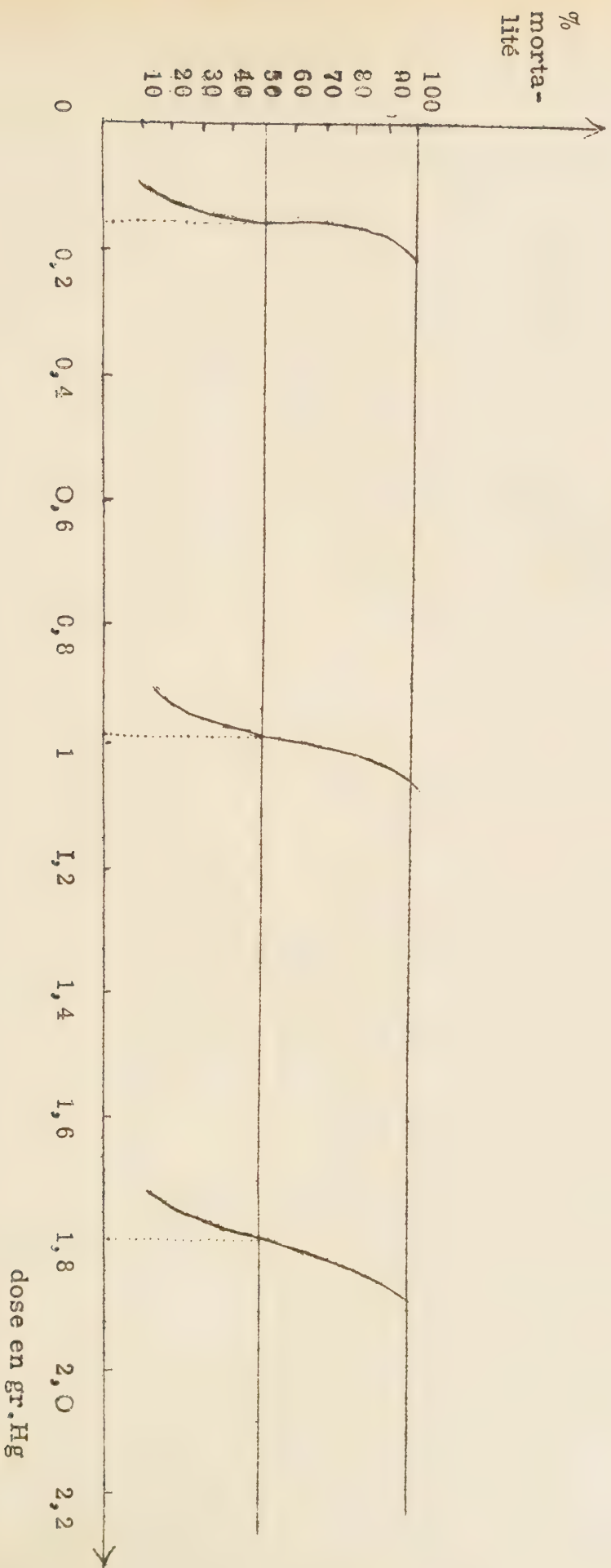
(voir tableau ci-après)

TABLEAU I

Essais comparatifs de toxicité aiguë de l'I N H et de ses deux dérivés (sel sodique de (N-méthylène-sulfoxylate)-isonicotinoylhydrazide et sel sodique de (N-méthylène-sulfonate)-isonicotinoylhydrazide :

		S O U R I S S U R V I V A N T E S							
	Doses	1 ^e jour	2 ^e jour	3 ^e jour	4 ^e jour	5 ^e jour	6 ^e jour	7 ^e jour	8 ^e jour
I. N. H.	0,12g/kg	10	10	10	10	10	9	8	8
	0,15g/kg	10	9	9	9	9	8	8	8
	0,18g/kg	10	3	2	2	2	2	2	2
Dérivé méthylène sulfoxylate de l'I. N. H.	0,8g/kg	10	10	10	10	10	10	10	10
	1g/kg	10	10	10	10	10	10	10	10
	1,2g/kg	10	10	10	10	10	10	9	9
	1,5g/kg	10	10	10	10	9	9	9	8
	1,8g/kg	10	8	7	7	6	6	6	6
Dérivé méthylène sulfonate de l'I. N. H.	0,4g/kg	10	10	10	10	10	10	10	10
	0,6g/kg	10	10	10	10	10	10	10	10
	0,8g/kg	10	10	10	10	10	10	10	10
	1g/kg	10	5	5	5	5	5	5	5
	1,2g/kg	10	4	4	4	4	4	4	2

Dose létale 50 comparée de l'INH et de ses dérivés méthylène-sulfoxylate de sodium et méthylène-sulfonate de sodium :



La deuxième méthode est celle préconisée par Wiechowski. Aux doses croissantes essayées, on note le nombre de survies. On fait un tableau comportant des doses croissantes donnant 100 % de survie jusqu'à celles occasionnant 0% de survie.

On calcule les nombre a qui sont les différences entre le nombre de survies de 2 doses consécutives et les nombres b qui sont les moyennes entre 2 doses consécutives.

La DL 50 est donnée par la formule :

$$DL\ 50 = \frac{ab}{n} \quad \begin{array}{l} ab = \text{somme des produits } a \times b \\ n = \text{nombre d'animaux.} \end{array}$$

La dose léthale 50 de l'I N H est donc, d'après la formule de Wiechowski :

$$DL\ 50 = \frac{ab}{n} = \frac{(2 \times 0,110) + (6 \times 0,165) + (2 \times 0,190)}{10} \\ = 0,159\ g$$

Dose léthale 50 du sel sodique de N-(méthylène-sulfoxyrate)-iso-nicotinoylhydrazide :

$$DL\ 50 = \frac{ab}{n} = \frac{(1 \times 1,100) + (1 \times 1,350) + (3 \times 1,65) + (5 \times 1,9)}{10} \\ = 1,690\ g.$$

Dose léthale 50 du sel sodique de N-(Méthylène-sulfonate)-isonicotinoylhydrazide :

$$DL\ 50 = \frac{ab}{n} = \frac{(5 \times 0,900) + (3 \times 1,100) + (2 \times 1,3)}{10} \\ = 1,040\ g.$$

METHODE DE WIECHOWSKI

	Dose administrée en gramme	Nombre de Souris	a - différence entre le nombre de survies de 2 doses consécutives.	b - moyenne entre 2 doses con- sécutives.
I.N.H.	0,100	10		
	0,120	8	2	0,110
	0,150	8	0	0,135
	0,180	2	6	0,165
	0,200	0	2	0,190
	0,220	0	0	0,210
Dérivé méthylène sulfoxylate de 1'I.N.H.	1,000	10		
	1,200	9	1	1,100
	1,500	8	1	1,350
	1,800	5	3	1,650
	2,000	0	5	1,900
	2,200	0	0	2,100
Dérivé méthylène sulfonate de 1'I.N.H.	0,800	10		
	1,00	5	5	0,900
	1,200	2	3	1,100
	1,400	0	2	1,300
	1,600	0	0	1,500

CALCUL D'ERREUR :

On applique la formule de l'écart-type :

$$\sqrt{\frac{d^2}{N(N-1)}}$$

d étant la différence entre le chiffre moyen et le chiffre trouvé à chaque mesure. Ici, d est le produit $\Delta a \times \Delta b$?

a est la différence entre la moyenne des valeurs de a et la valeur de a trouvée pour deux doses consécutives.

b est la différence entre la moyenne des valeurs de b et la valeur de b trouvée pour deux doses consécutives.

Calcul d'erreur pour l'INH :

$$\text{moyenne de a : } \frac{2 + 6 + 2}{5} = 2$$

$$\text{moyenne de b : } \frac{0,11 + 0,135 + 0,165 + 0,19 + 0,21}{5} = 0,162$$

Ecart-type :

$$= \sqrt{\frac{d^2}{N(N-1)}} = \sqrt{\frac{(a - b)^2}{N(N-1)}}$$

$$= \sqrt{\frac{2^2 (0,162 - 0,135)^2 + 4^2 (0,162 - 0,165)^2 + 2^2 (0,162 - 0,210)^2}{10 (10-1)}}$$

$$= \sqrt{\frac{(4 \times 0,000729) + (16 \times 0,000003) + (4 \times 0,002304)}{10 (10-1)}} = \sqrt{\frac{0,01218}{90}}$$

$$= \sqrt{0,00013} = 0,011$$

$$\text{d'où : DL 50 I N H} = 0,162 \text{ g} \pm 0,011$$

Le calcul d'erreur se fait de la même manière pour les 2 autres produits.

Nous avons trouvé :

DL 50 du dérivé méthylène-sulfoxyate = 1,7 g + 0,1

DL 50 du dérivé méthylène-sulfonate = 1,0 g + 0,2

II - ETUDE COMPARATIVE DE TOXICITE CELLULAIRE DE L'INH,
du sel sodique de (N-méthylène-sulfoxyate)-isonicotinylhydrazide
et du sel sodique de (N-méthylène-sulfonate)-isonicotinylhydrazide :

La pharmacologie cellulaire qui étudie l'action des médicaments au niveau de la cellule elle-même est appelée à devenir une branche importante de la pharmacodynamie grâce au progrès des techniques d'étude utilisées en chimiothérapie antimitotique.

Dans le présent travail, nous avons adapté une méthode de titrage de virus, couramment employée en virologie, à l'étude de la cytotoxicité d'une drogue, comme l'ont proposé A.GÉRMAN, J. PAUTY (Ann. Pharm. Françaises 1961 sous presse) et J. PAUTY (Thèse Pharmacie) qui utilisent des cultures de fibroblastes de poulet.

La technique consiste à cultiver en milieu liquide des cellules animales trypsinisées. Lorsque les cellules sont confluentes, on fait agir les substances à étudier à des concentrations croissantes. On détermine la concentration pour laquelle on observe la cytolyse, c'est-à-dire la "dose cytotoxique"

Matériel et méthode :

Les cellules utilisées dans la présente étude proviennent de la souche cellulaire appelée RB₁ isolée au laboratoire du Docteur VIEUCHANGE par de BRION et GRUEST (8) (Nous les remercions de nous l'avoir fournie).

Cette souche a été isolée à partir du rein de bovidés et entretenues depuis 1957 par passage successif après trypsination sur milieu N° 6 de l'Institut Pasteur à l'hydrolysate de caséine, mis au point par LEPINE et coll. La composition de ce milieu est la suivante :

Hydrolysate de caséine	50 ml
Bicarbonate de sodium à 55°/° additionné de	
rouge neutre	20 ml
Sérum de poulain filtré	50 ml
Pénicilline	100000 unités
Dihydromycine	0,05 g

0,1 ml de suspension de cellules RB₁ trypsinisées est introduit dans chacun des tubes à essais à fond plat contenant une lamelle de dimensions 12 mm/32 mm, renfermant 2 ml de milieu N° 6. Sur cette lamelle, les cellules se multiplient en couche monocellulaire. Cette technique permet la coloration directe in situ des cellules fixées sur ces lamelles par la méthode de May-Grunwald et Giemsa.

La photographie 1 montre l'aspect des cellules RB₁ normales, tandis que la photographie 2, celui des cellules qui ont subi une dose toxique des substances essayées.

Ainsi, nous avons trouvé que pour l'I N H la dose cytotoxique est de $2,5 \times 10^{-3}$, celle du sel sodique de (N-méthylène-sulfoxylate)-isonicotinylhydrazide est de 9×10^{-3} et celle du sel sodique de (N-méthylène-sulfonate)-isonicotinylhydrazide est de l'ordre de 2×10^{-2} .

Conclusion - Cette technique de culture permet une étude simple de toxicité à l'échelle cellulaire. Evidemment, pour des substances à activité cellulaire spécifique telles que les antiméitotiques, on peut procéder à une analyse plus fine des désordres causés sur les noyaux ou le cytoplasme ainsi que la



Cellules RB₁ normales



Cellules RB₁ après action "cytotoxique"
de INH à la dose de $2,5 \times 10^{-3}$

caryocinèse. La technique d'éclatement en milieu hypotonique permettrait aussi d'étudier l'effet des diverses drogues sur les chromosomes. On peut envisager d'étudier l'action d'une substance pharmacodynamique sur les cellules d'un organe ou d'un tissu donné (par exemple sur la culture de moelle épinière ou la culture de fibroblastes de coeur d'embryon de poulet ou sur des cellules hématopoïétiques, etc...) Dans ce travail, nous nous limitons à la détermination comparative de la "dose cytotoxique" de nos trois produits. Nous constatons que les résultats obtenus sont bien concordants avec ceux obtenus sur la Souris c'est-à-dire que le sel sodique de (N-méthylène-sulfoxyrate)-isonicotinylhydrazide est beaucoup moins toxique, même au niveau cellulaire, que le sel sodique de (N-méthylène-sulfonate)-isonicotinylhydrazide et l'I N H.

III - ETUDE COMPARATIVE DE TOXICITE SANGUINE DE L'I.N.H., du sel sodique de N-(méthylène-sulfoxyrate)-isonicotinylhydrazide et du sel sodique de N-(méthylène-sulfonate)-isonicotinylhydrazide.

Il est maintenant reconnu qu'un certain nombre de médicaments sont susceptibles de causer chez l'homme des cas de cytopénie sanguine parfois mortelle. Ce groupe de médicaments comporte le chloramphénicol, l'antipyrine, le pyramidon, etc...

Dans le cadre général de nos recherches sur la relation entre la structure chimique et l'activité cytopéniante des médicaments, il nous a semblé intéressant de faire une étude hématologique comparative de l'INH et de ses deux dérivés, sur une lignée pure de Souris.

Matériel et méthodes :

Nous avons injecté pendant un mois à trois lots comportant chacun 10 Souris Swiss mâles, âgées de 3 mois et pesant environ 30 g. :

1er lot : 15 mg/kg/jour

2è lot : dérivé méthylène-sulfoxyate : 90 mg/kg/jour

3è lot : dérivé méthylène-sulfonate : 60 mg/kg/jour

Nous avons choisi ces doses d'après les résultats de nos essais de toxicité qui ont prouvé que le dérivé méthylène-sulfoxyate est de beaucoup le moins toxique des trois produits.

Pour l'étude hématologique, nous avons utilisé le procédé de numération différentielle directe des polynucléés et des mononucléés décrits par Anguiano (G) et Ancira (G.) (3). Cette méthode beaucoup moins laborieuse et plus rapide que la méthode classique des frottis, convient parfaitement à une telle étude ou de nombreuses numérations doivent être faites en même temps. L'analyse statistique faite par Mathé et Kline (33) a montré que l'identification des cellules est meilleure par la méthode de frottis, mais que l'uniformité de répartition supérieure des différents globules blancs dans la cellule, compense non seulement les difficultés d'identification, mais permet d'obtenir des résultats plus valables que la méthode des frottis, même en étudiant moins d'éléments.

L'émulsion est faite au 1/20 en pipette de Potain, et la lecture en cellule de Thoma.

La formule du liquide de dilution est la suivante :

alcool méthylique	10 ml
Giemsa	4 ml
Bleu de toluidine à 0,25%	4 ml
tampon acétique 0,1 M (pH 5)	4 ml
Eau distillée	20 ml

La numération des réticulocytes est faite après coloration par le bleu de Unna.

Pour étudier la thrombocytose, on fait la dilution au 1/20 en pipette de Potain avec une solution d'oxalate d'ammonium à 1%. La numération des plaquettes se fait au microscope en contraste de phase.

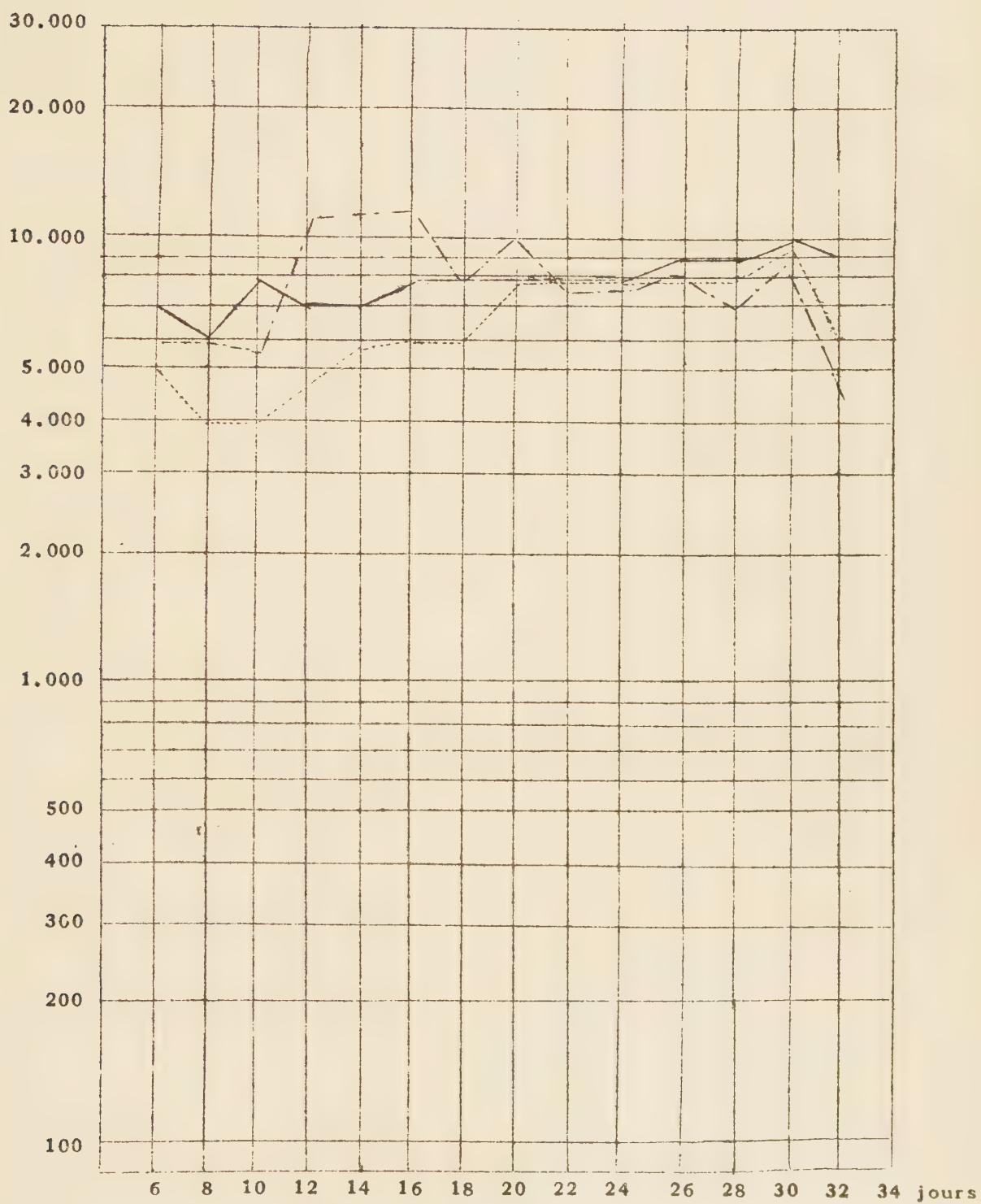
Conclusion :

Pour l'étude hématologique, nous avons utilisé l'INH à la dose de 15 mg par kilo, dose couramment utilisée en thérapeutique. A cette dose, l'INH ne produit pas la cytopénie chez les Souris de lignée Swiss. Ni le sel sodique de (N-méthylène-sulfoxyrate)-isonicotinoylhydrazide, administré à une dose 6 fois plus forte que celle d'INH (90 mg par jour), ni le sel sodique de (N-méthylène-sulfoxyrate)-isonicotinoylhydrazide à la dose 4 fois plus forte que celle d'INH, ne produisent la cytopénie sanguine chez la même lignée de souris.

RESULTATS DE L'ETUDE HEMATOLOGIQUE

	6°j.	8°j.	10°j.	12°j.	14°j.	16°j.	18°j.	20°j.	22°j.	24°j.	26°j.	28°j.	30°j.	32°j.
Mononuclease I.N.H.	7.000	5.500	8.200	7.100	7.200	8.000	8.100	8.100	8.100	8.200	9.100	9.000	10.000	9.000
	5.000	4.000	4.100	4.700	5.700	6.200	6.200	7.800	7.900	8.000	8.200	8.100	9.900	6.200
	6.500	5.500	5.400	11.100	7.100	13.200	8.000	10.800	6.400	6.600	7.900	7.800	9.000	4.500
Polynuclease I.N.H.	4.100	3.500	4.000	3.400	3.000	4.100	4.000	4.200	5.000	5.100	4.000	4.100	4.000	5.100
	2.500	3.000	3.100	2.000	3.100	3.000	3.100	3.000	3.600	3.700	3.900	3.900	3.300	3.400
	3.400	3.400	2.000	5.400	5.900	5.000	3.700	4.700	3.700	3.800	4.900	5.000	4.100	2.200
Reticulocyte I.N.H.	1,7%	1,8%	1,8%	2%	2%	2%	1,4%	1,5%	1,5%	2%	2,5%	3%	3%	3%
	1,2%	1,3%	1,2%	1,2%	1,5%	1,3%	1,8%	1,5%	1,2%	1,3%	1,6%	2%	2%	2%
	1,5%	1,6%	1,4%	1,2%	1,2%	1,3%	1,4%	1,5%	1,3%	1,7%	2,2%	2,9%	2,8%	2,8%
Thrombocyte I.N.H.	960.000	810.000	800.000	900.000	1.100.000	1.200.000	1.200.000	1.200.000	1.200.000	1.100.000	1.100.000	1.200.000	1.200.000	1.000.000
	1.000.000	920.000	1.000.000	1.000.000	1.000.000	1.100.000	900.000	900.000	1.000.000	1.000.000	900.000	900.000	800.000	750.000
	1.100.000	950.000	930.000	910.000	1.200.000	1.200.000	1.100.000	1.000.000	1.100.000	1.100.000	1.100.000	1.100.000	1.100.000	960.000

MONONUCLEAIRES

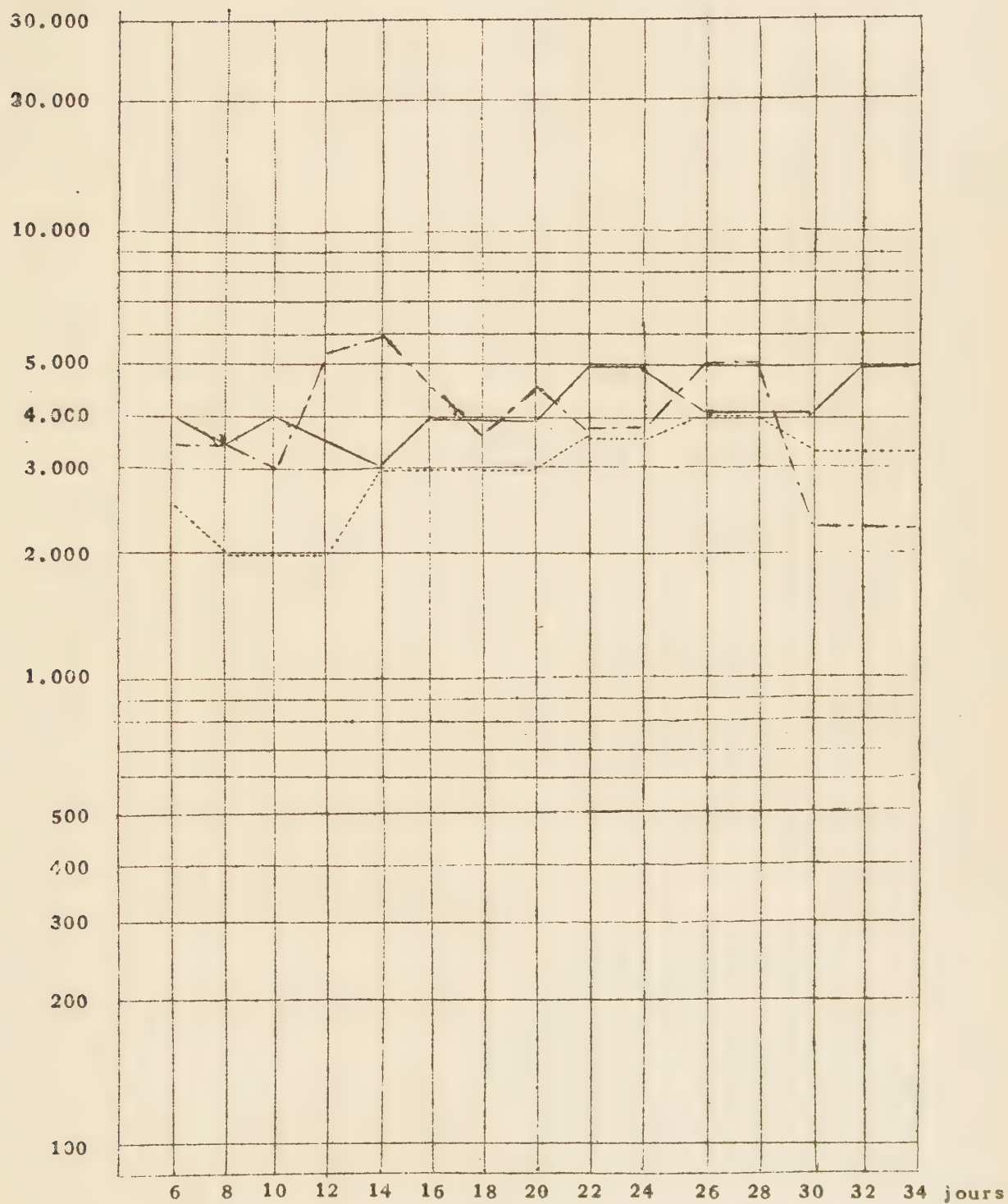


————— I N H 15 mg/kg/jour

..... I N H (méthylène-sulfoxylate) 90 mg/kg/jour

— . — . — . — . — I N H (méthylène-sulfonate) 60 mg/kg/jour

POLYNUCLEAIRES

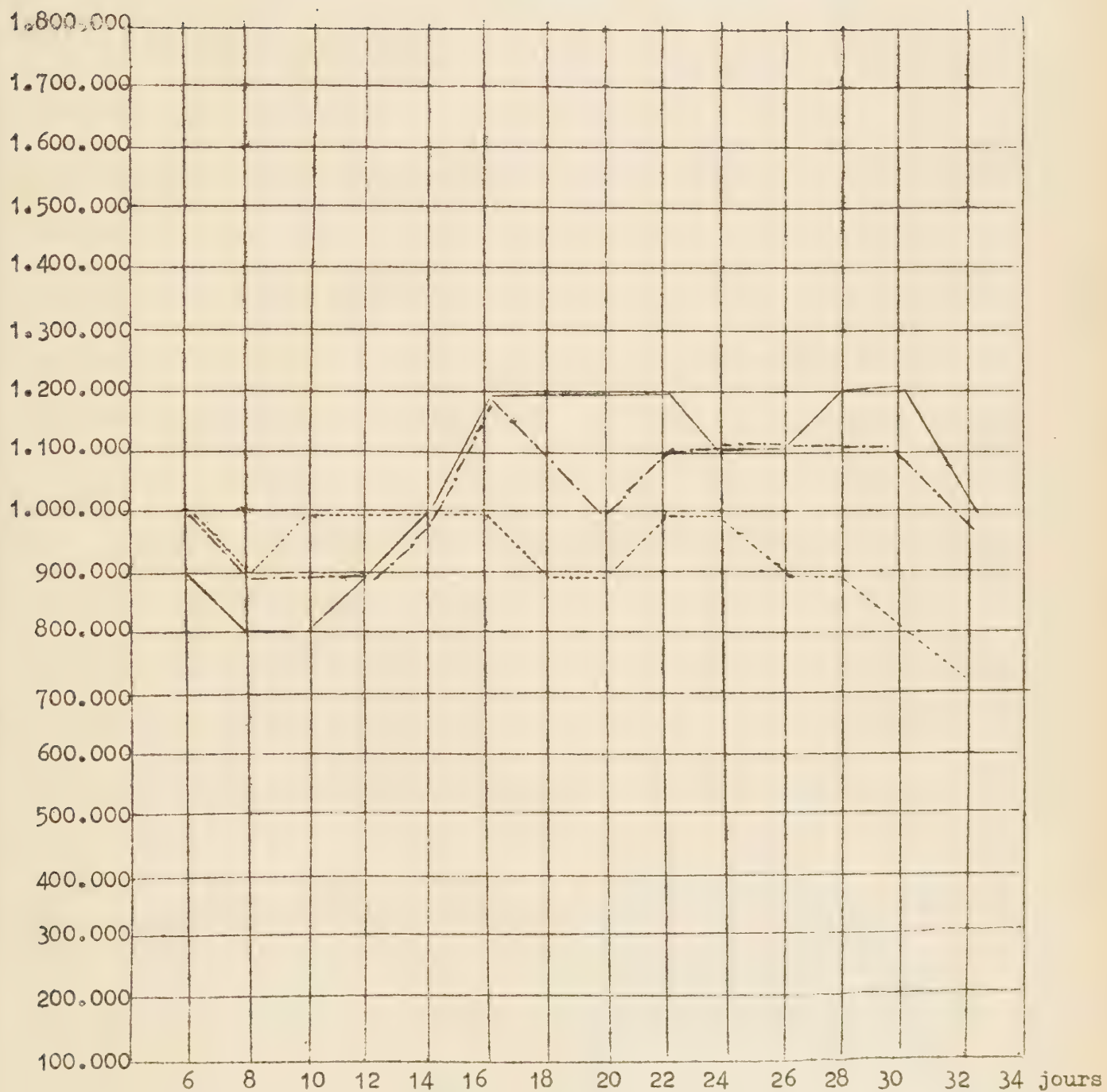


—•— INH 15 mg/kg/jour

..... INH (méthylène-sulfoxylate) 90 mg/kg/jour

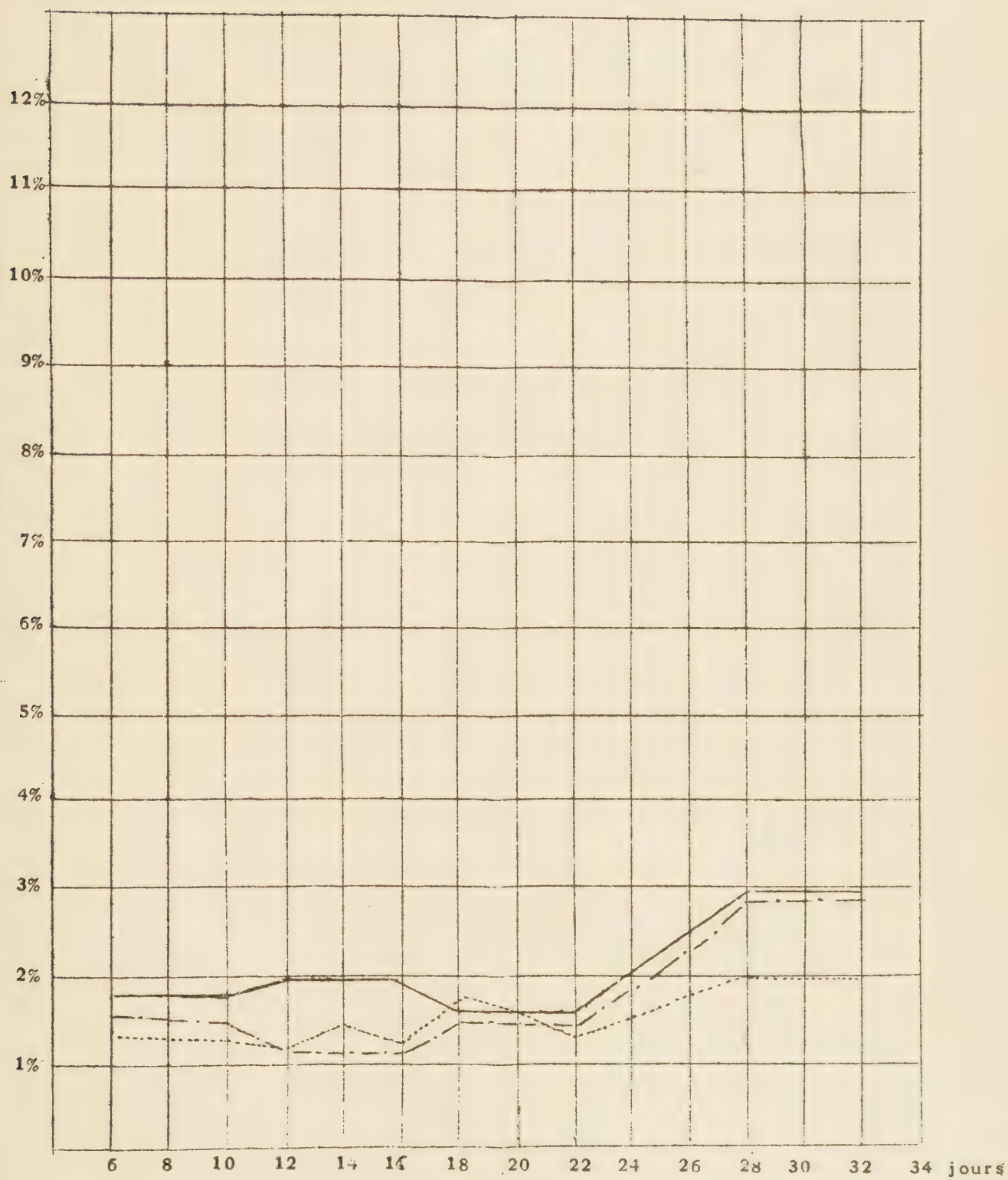
—•— INH (méthylène-sulfonate) 60 mg/kg/jour

PLAQUETTES



— I.N.H. 15 mg/Kg/jour
 ... I.N.H. - (méthylène-sulfoxylate) 90 mg/Kg/jour
 --- I.N.H. - (méthylène-sulfonate) 60 mg/Kg/jour

RETICULOCYTES



—— IN H 15 mg / kg / jour
..... IN H (méthylène- sulfoxyate) 90 mg / kg / jour
----- IN H (méthylène-sulfonate) 60 mg / kg / jour

SIXIEME PARTIE

=====

ETUDE DU MECANISME D'ACTION

PLAN DE LA SIXIEME PARTIE

I - MECANISME D'ACTION DU DERIVE METHYLENE-SULFOXYLATE
DE L'INH:

- voie parentérale
- voie buccale

II- MECANISME D'ACTION DU DERIVE METHYLENE-SULFO-
XYLATE DU P.A.S.

- voie parentérale
- voie buccale.

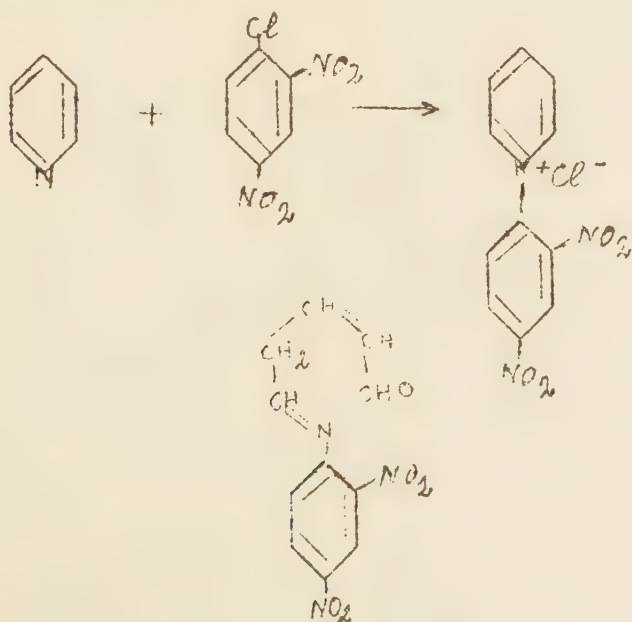
I - ETUDE DU MECANISME D'ACTION DU DERIVE METHYLENE-SULFOXYLATE DE L'I.N.H.

Nous nous sommes demandés, devant ces résultats obtenus, si ces dérivés méthylène-sulfoxyate de sodium de l'I.N.H. injectés dans l'organisme par voie parentérale, ne sont pas hydrolysés immédiatement ou d'une manière retardée en leur constituant et qu'en réalité c'est l'isoniazide qui agit sur le bacille de Koch et non son dérivé. Pour essayer d'élucider ce problème, nous avons par conséquent dosé dans le sérum de Lapins l'INH comparativement avec son dérivé méthylène-sulfoxyate de sodium.

Dosage dans le sérum de l'I N H et de son dérivé méthylène -sulfoxyate de sodium par leur noyau pyridinique :

Pour les dosages dans le sérum, nous avons utilisé la technique de Scott (44) pour évaluer les concentrations sanguines de l'I N H et de son dérivé. En effet, cette méthode permet de doser le noyau pyridinique commun aux deux substances à l'aide du chloro-1 dinitro-2, 4 benzène en milieu alcalin. Le principe de ce dosage est le suivant :

Le dérivé halogéné aromatique (ici, le chloro-1 dinitro-2, 4 benzène) est utilisé) se combine avec le noyau pyridique pour donner un sel de pyridinium que l'hydrolyse alcaline scinde en dérivé iminé de l'aldéhyde glutarique fortement coloré, selon la réaction :



Matériel et méthodes :

Nous utilisons une solution de chloro-I dinitro-2,4 benzène à 5 p.100 dans éthanol absolu.

Deux millilitres de sérum sont déféqués au moyen d'acide trichloracétique à 20 p.100 à volumes égaux.

A un millilitre de filtrat, on ajoute 0,1 g de borax, puis 5 millilitres de solution de chlorodinitrobenzène. On mélange puis on porte au bain-marie pendant 15 minutes.

On obtient une coloration rouge-pourpre.

On lit au spectrophotomètre Jobin-Yvon avec $\lambda = 5300^{\circ} \text{A}$ comparativement à une gamme étalon de I N H .

Les résultats des dosages dans le sérum de l'I N H et de son dérivé méthylène-sulfoxyate sont consignés dans le tableau ci-après et explicités dans la figure 3.

Ces dosages nous ont permis de vérifier que les concentrations sanguines de l'I N H et de son dérivé sont sensiblement les mêmes en fonction du temps.

Chaque Lapin a reçu par la veine de l'oreille 200 mg par kilo de l'I N H et 345 mg par kilo du dérivé méthylène-sulfoxyate de sodium de l'I N H , en tenant compte du poids d'I N H pour le dérivé afin que les résultats soient comparables. Nous voyons que la concentration sanguine d'I N H et de son dérivé atteint le maximum vers la 3ème heure.

Cette méthode qui dose la fonction pyridinique évalue aussi bien les dérivés acétylés de l'I N H que l'I N H non acétylé, car on sait

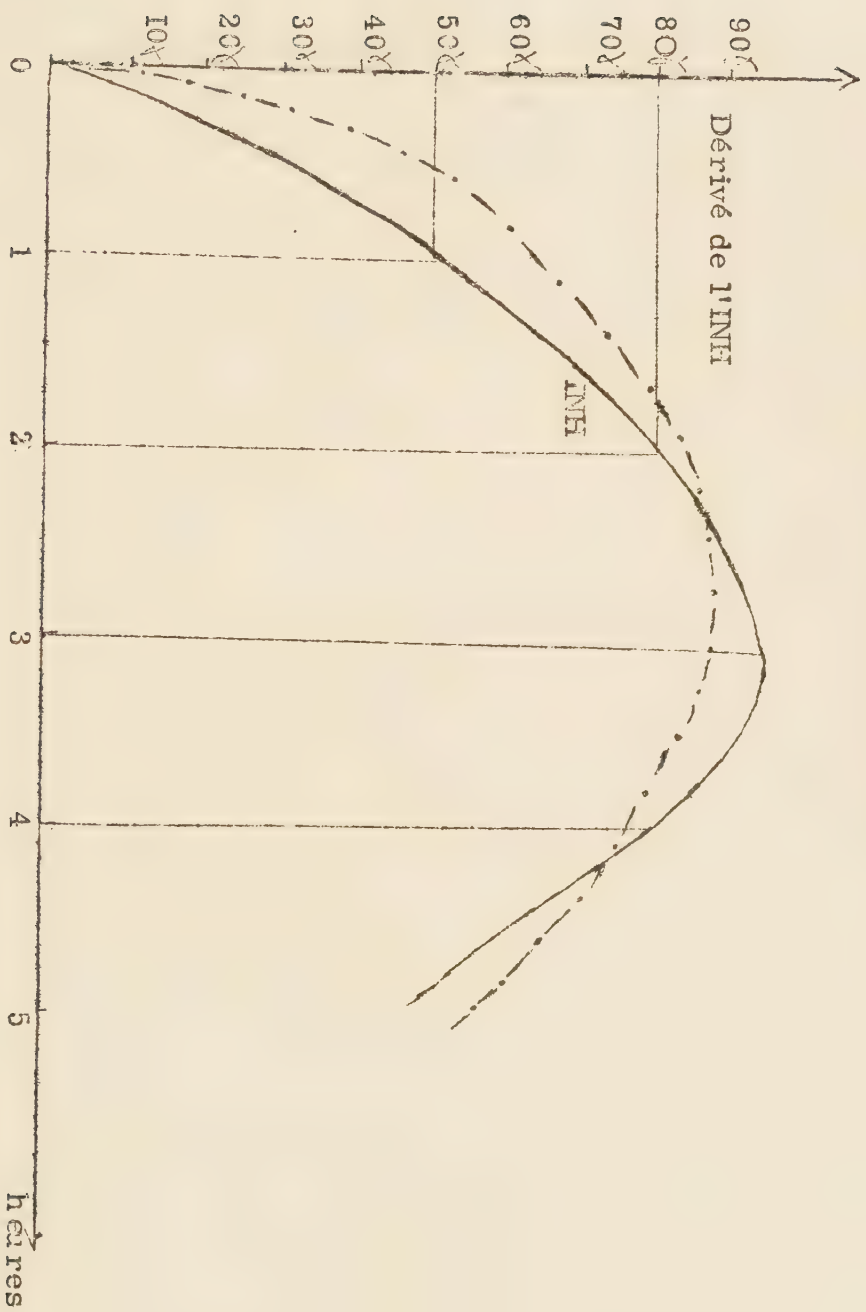
que l'I N H injecté dans l'organisme est en partie inactivé par l'acétylation de la fonction hydrazide libre. Nous espérons que la substitution de la fonction hydrazide par le groupement méthylène-sulfoxyate de sodium, tout en ne diminuant pas l'activité biologique de la molécule (ce que nous avons pu montrer précédemment) entrave l'inactivation de l'isoniazide par l'acétylation.

TABLEAU I

Concentration sanguine en χ par millilitre , en fonction du temps,
de l'I N H et de son dérivé, le sel sodique de (N-méthylène-sulfoxylate)
-isonicotylhydrazide (voie parentérale) :

		1° heure	2° heure	3° heure	4° heure	5° heure
Dosage du noyau pyridinique	I.N.H.	50	80	95	80	48
	dérivé de l'I.N.H.	65	84	87	77	55
Dosage de la Fonction hydrazide	I.N.H.	77	68	52	39	30
	dérivé de l'I.N.H.	15	13	13	10	7

Désage du noyau pyridinique de l'INH et de son
dérivé méthylène-sulfoxylate de sodium



Dosage différentiel dans le sérum de l'I N H et de son dérivé par la fonction hydrazide libre :

Pour montrer que le dérivé de l'I N H ne libère pas immédiatement dans le sang l'I N H par hydrolyse, nous devons utiliser une méthode qui dose uniquement l'I N H et non son dérivé. Dans ce but, nous avons utilisé la méthode de Yantchitch permettant le dosage colorimétrique de la fonction hydrazide au moyen de la vanilline en milieu acide (53).

En effet, le dérivé méthylène-sulfoxyate de sodium de l'I N H ayant sa fonction hydrazide substituée ne donne pas de coloration dosable par ce même réactif.

Matériel et méthodes :

On utilise une solution alcoolique de vanilline à 2 p. 100.

On précipite le sérum au moyen d'acide trichloracétique à 20 p. 100, à volume égaux.

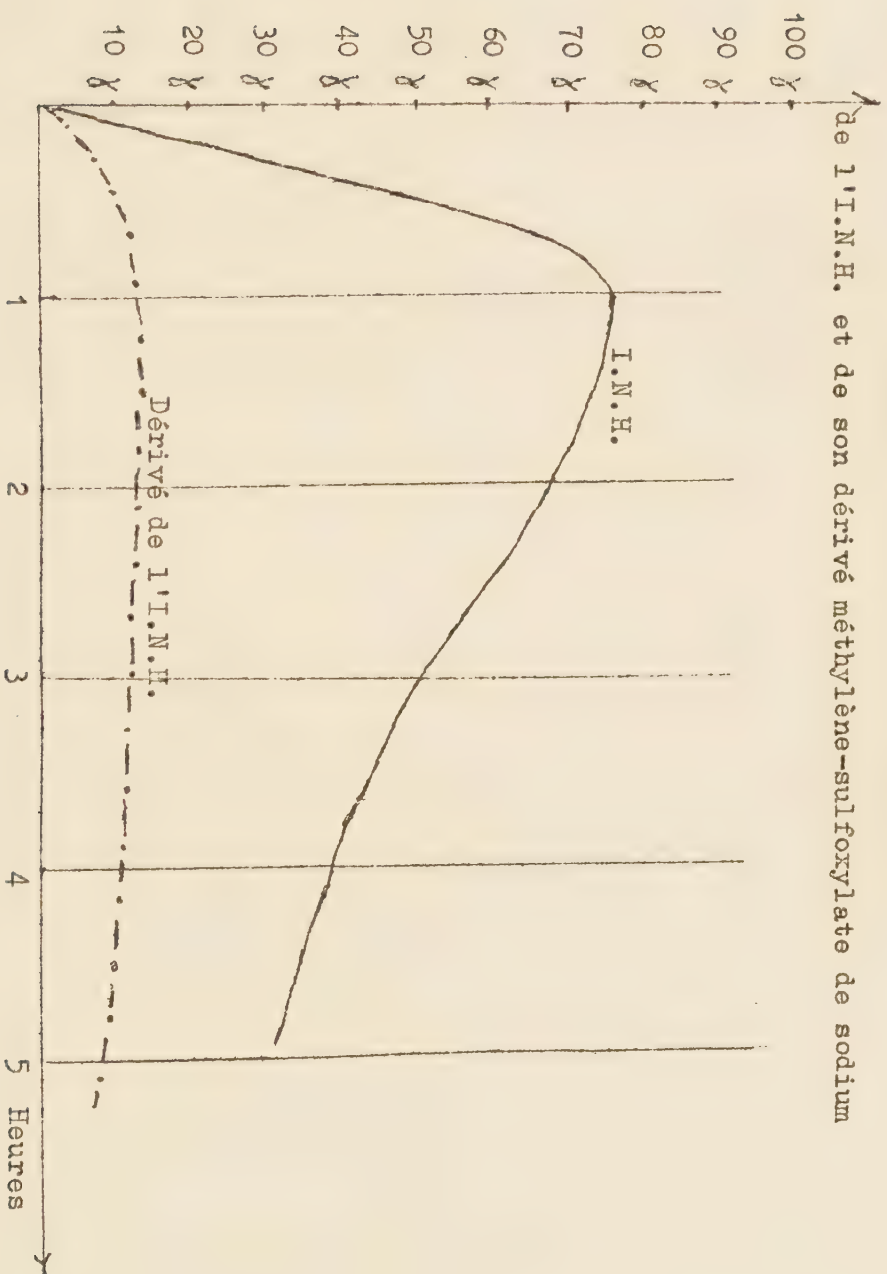
A 1 ml. de filtrat, on ajoute 1 ml de la solution alcoolique de vanilline, puis une goutte d'acide chlorhydrique concentré et l'on complète à 3 ml à l'aide de l'alcool absolu.

La coloration jaune qui se développe est évaluée au bout d'un quart d'heure au spectrophotomètre Jobin-Yvon avec $\lambda = 4200 \text{ Å}$

Les résultats obtenus par les dosages des sérums prélevés aux différentes heures après administration de l'I N H et de son dérivé sont résumés dans le tableau ci-après et la figure 2.

On voit que dès la fin de la première heure, chez le lapin qui a reçu l'INH à la concentration sanguine de ce produit atteint son maximum, alors que celui qui a reçu le dérivé méthylène-sulfoxyate de sodium ne libère dans son sang qu'une quantité insignifiante d'I N H libre.

Dosage de la fonction hydrazide



Etude du mécanisme d'action par voie buccale chez le Lapin :

Nous avons administré par voie buccale, à l'aide d'une sonde duodénale en polyvinyle, 280 mg par kilo de dérivé méthylène-sulfoxyate de l'I N H . Le sang a été prélevé à la 1ère, 2ème, 4ème, 5ème, 7ème et 9ème heure. Nous avons dosé dans le plasma d'une part la fonction hydrazide (par la méthode de Yantchitch) et d'autre part le noyau pyridinique (par la méthode de Scott).

A titre de comparaison, nous avons également dosé par ces deux méthodes (fonction hydrazide et noyau pyridinique) l'I N H administré par voie buccale à la dose de 160 mg par kilo. (Cette quantité calculée est équivalente en I N H à 280 mg par kilo de dérivé méthylène-sulfoxyate de l'Isoniazide).

Ces dosages nous permettent de conclure que la voie buccale:

1°) le dérivé de l'I N H reste stable sans être hydrolysé après la traversée de la paroi intestinale.

2°) la concentration sanguine de ce dérivé est aussi élevée que celle de l'I N H et ne diminue que progressivement sans être hydrolysé même à la 9ème heure après administration; la concentration sanguine du dérivé à la 9ème heure reste supérieure à celle de l'I N H .

3°) l'I N H passe dans le sang plus vite que le dérivé de l'I N H mais s'élimine plus vite que ce dernier.

A noter chez un Lapin des crises convulsives violentes après injection d'I N H suivies d'une profonde asthénie qui a duré 3 jours, alors que ce même Lapin qui a reçu une autre fois le dérivé de l'I N H n'a montré aucun symptôme convulsif.

Dosage du noyau pyridinique
(voie buccale)

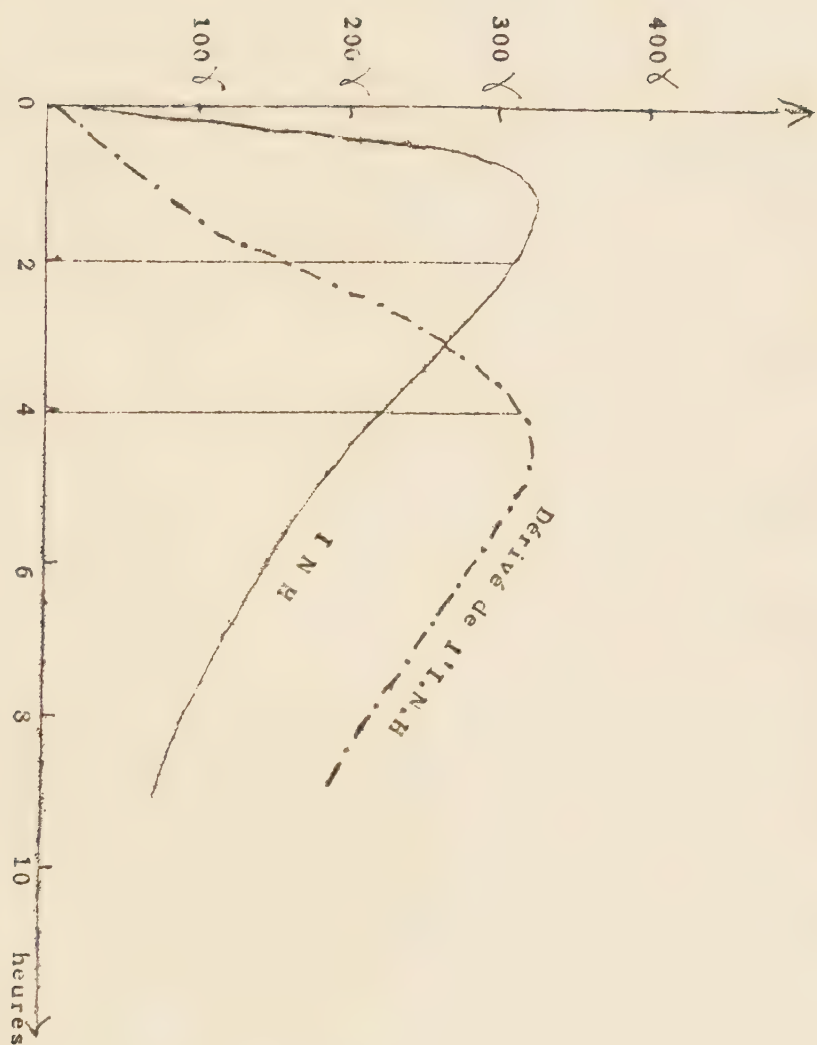
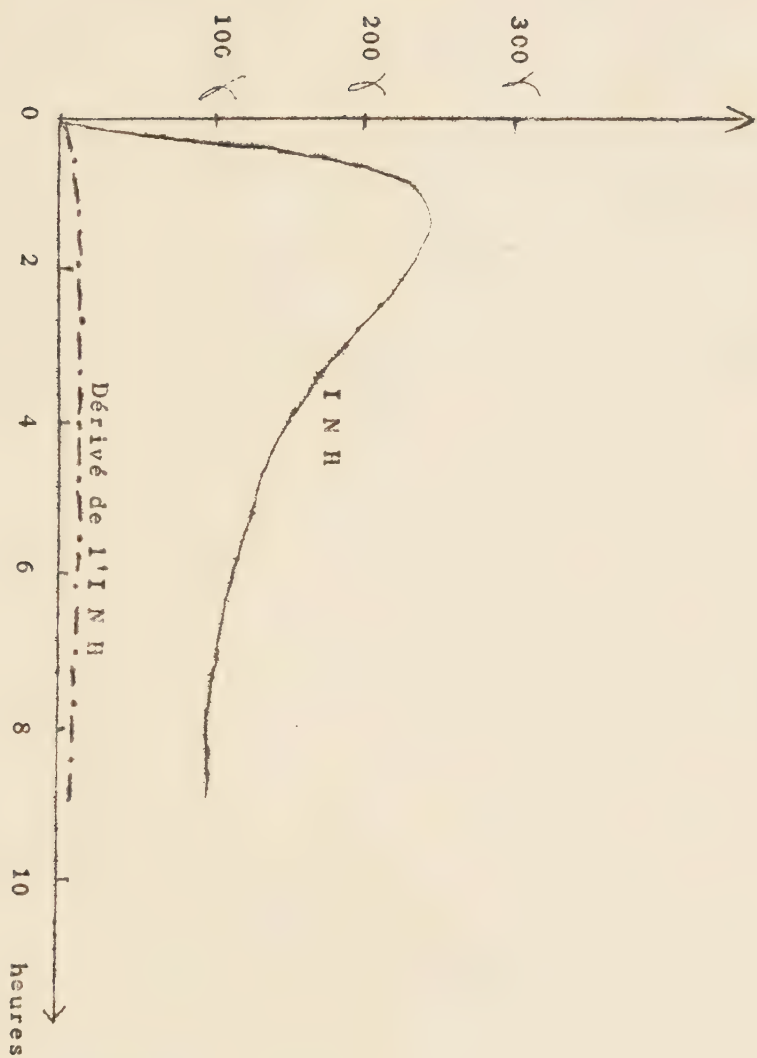


TABLEAU II

Concentration sanguine en γ par millilitre, en fonction du temps, de l'I N H et de son dérivé, le sel sodique de (N-méthylène-sulfoxylate) -isoniaotylhydrazide (voie buccale) :

		1° heure	2° heure	4° heure	6° heure	9° heure
Dosage du noyau pyridinique	I. N. H.	320	310	225	150	75
	Dérivé de l' I. N. H.	60	150	315	280	180
Dosage de la fonction hydrazide	I. N. H.	240	225	160	115	100
	Dérivé de l' I. N. H.	10	13	10	10	8

Dosage de la fonction hydrazide
(voie buccale)



II - ETUDE DU MECANISME D'ACTION DU DERIVE METHYLENE-SULFOXYLATE DU P.A.S.

Nous nous sommes demandé, tout comme pour le dérivé de l'isoniazide, si le dérivé méthylène-sulfoxylate de sodium administré à l'animal ne libère pas le P.A.S. par hydrolyse et que c'est le P.A.S. qui agit in vivo et non son dérivé qui resterait intact.

Dosage dans le sérum de la fonction hydroxy du P.A.S. et de son dérivé méthylène-sulfoxylate de sodium :

Le dosage de la fonction OH permet d'évaluer la quantité totale de P.A.S. dans le sang, qu'il soit acétylé ou dans l'organisme.

Nous avons utilisé la méthode de Dickenson et Kelly (16) qui est basée sur la condensation du diazoïque de l'acide sulfanilique avec une solution alcaline de P.A.S. ou de son dérivé.

Matériel et méthodes :

Deux millilitres de sérum, dilués avec deux millilitres d'eau, sont désalbuminés avec deux millilitres de solution d'acide trichloracétique à 10%. 2 ml de filtrat clair sont alcalisés par 0,25 ml de solution de NaOH à 30%, puis additionnés de 0,25 ml de réactif diazo (préparé par combinaison d'acide sulfanilique en solution chlorhydrique avec le nitrite de sodium).

Réactif :

a) diazoïque de l'acide sulfanilique.

Dissoudre 1 g d'acide sulfanilique pur dans 100 ml d'acide chlorhydrique normal. Refroidir vers 5° C dans un mélange d'eau et de glace et ajouter goutte à goutte en agitant, une solution molaire de nitrite de sodium (69 g par litre), jusqu'à ce qu'une goutte de la solution acide portée sur une

feuille de papier ioduro-amidonné y produise encore une tache deux minutes après la dernière addition de nitrite.

Ce réactif doit être conservé dans l'eau glacée et n'est utilisable que pendant quelques heures.

b) soude normale.

La solution doit être parfaitement limpide.

La coloration de la diazo-réaction obtenue est comparée à celle d'étalons contenant 10 à 20 mg par ml de para-aminosalicylate de sodium acide.

Un des deux Lapins reçoit par la veine de l'oreille une injection de 200 mg par kilo de para-amino-salicylate de sodium, l'autre une injection de 315 mg par kilo de sel disodique de l'acide (N-méthylène sulfoxyate)-amino-4 hydroxy-2 benzoïque. Ces quantités relatives des deux produits à injecter ont été calculées en tenant compte du poids de P.A.S. contenant le dérivé sulfoxyate de sodium du P.A.S. afin que la concentration sanguine de P.A.S. puisse être comparée à celle de son dérivé méthylène sulfoxyate.

Les prélèvements se font toutes les heures par ponction dans la veine de l'oreille jusqu'à la 9ème heure.

Les résultats des dosages sont résumés dans le tableau ci-après et dans la figure 3.

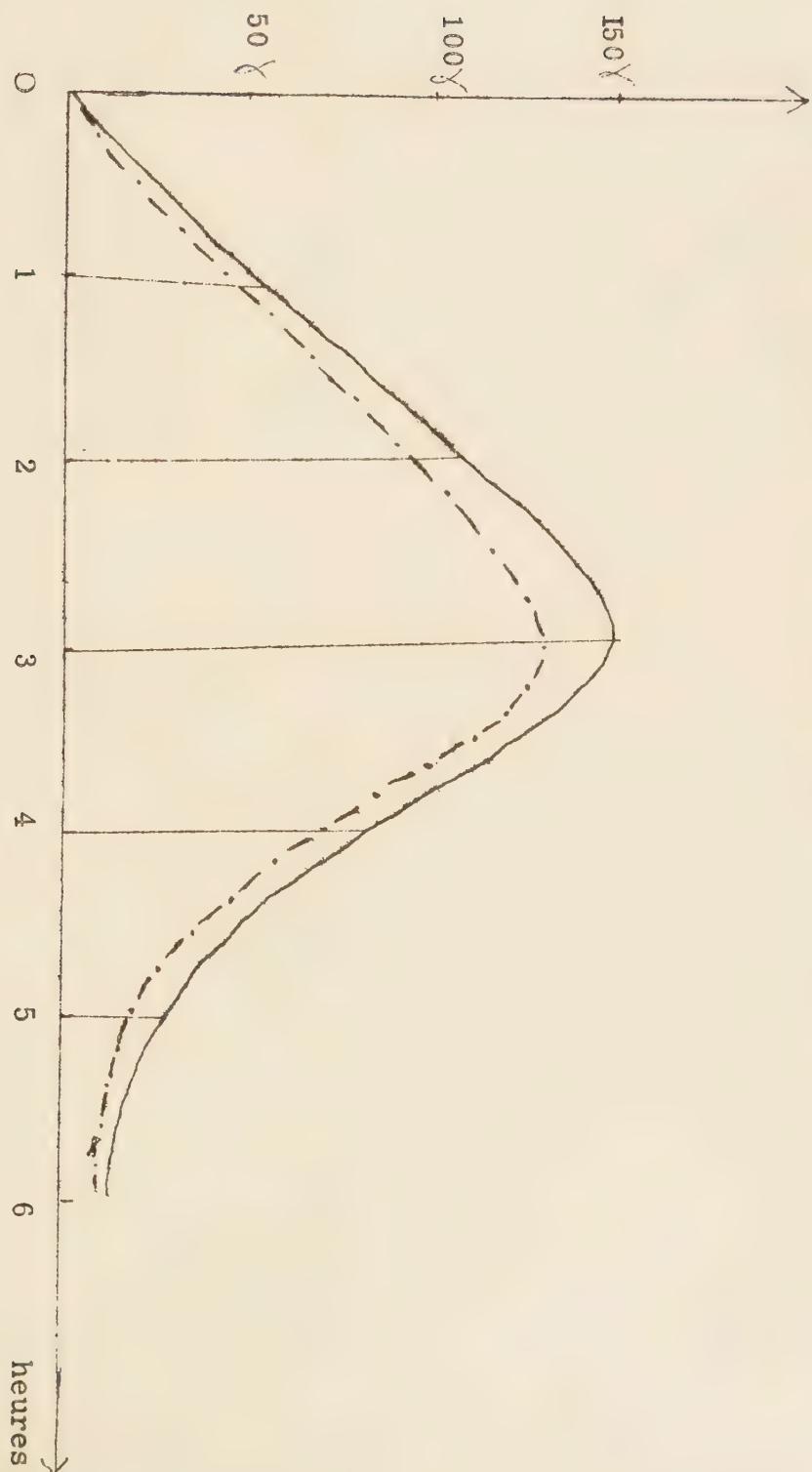
Nous constatons d'après cette courbe en fonction du temps, que les concentrations sanguines de chacun de ces deux produits atteignent le même maximum vers la fin de la 3ème heure. Au bout d'un certain temps après injection dans l'organisme, le P.A.S. est acétylé. Cependant, cette méthode dosant la fonction hydroxy évalue indifféremment le P.A.S. acétylé ou non. Ce qui expliquerait que le dérivé méthylène sulfoxyate de sodium qui n'est plus acétylable, sa fonction amine étant déjà substituée, présente au même moment la même concentration sanguine que celle du P.A.S.

TABLEAU III

Concentration sanguine en γ par millilitre, en fonction du temps, du P A S et de son dérivé, le sel disodique de l'acide (N-méthylène-sulfoxylate)-amino-4 hydroxy-2 benzoïque (voie parentérale)

		1° heure	2° heure	3° heure	4° heure	5° heure	6° heure
Dosage de la Fonction O.H.	P.A.S.	50	110	150	85	30	12
	Dérivé du P.A.S.	47	98	133	70	18	10
Dosage de la Fonction N.H. ₂	P.A.S.	55	116	160	98	20	7
	Dérivé du P.A.S.	30	35	30	22	17	4

dosage de la fonction OH du PAS et de son dérivé
méthylène-sulfoxylate de sodium



Dosage différentiel dans le sérum du P.A.S. et de son dérivé méthylène sulfoxyate de sodium à l'aide de la fonction amine :

Pour montrer que le dérivé méthylène sulfoxyate de sodium ne s'hydrolyse pas dans le sang, il est indispensable de doser la fonction amine du P.A.S. comparativement avec son dérivé dont la fonction amine est substituée. Dans ce but, nous avons utilisé la méthode de Desbordes et Henry (15).

La technique proposée par ces auteurs, inspirée de celle décrite par Paget (36) pour les sulfamides, consiste à diazoter la fonction amine aromatique et à copuler le chlorure de diazonium obtenu avec le thymol pour obtenir une réaction colorée dosable par photométrie. Le choix du thymol a été fait dans le but d'obtenir une coloration intense et stable.

Matériel et méthodes :

a) Réactifs :

- solution alcaline de thymol :

Thymol 5 g.
Soude normale 500 ml (à conserver dans la glacière)

- Solution mère du P.A.S. à 1% :

P.A.S. 0,10 g
Acide trichloracétique à 20%.. 5 ml
Eau distillée qsp 100 ml (stable pendant 24 heures à la glacière).

- Solution de nitrite de sodium :

Nitrite de sodium 0,50 g
Eau distillée 500 g

- Solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100
- Solution d'urée à 10 p.100
- Solution étalon de P.A.S. titré à 20 par ml :
solution mère de P.A.S. à 1 p.1000..... 2 ml
eau distillée qsp 100 ml

b) Mode opératoire :

Dans un tube à essai, on place 0,5 ml de sérum. On ajoute une quantité suffisante d'eau distillée pour obtenir un volume de 7 ml.

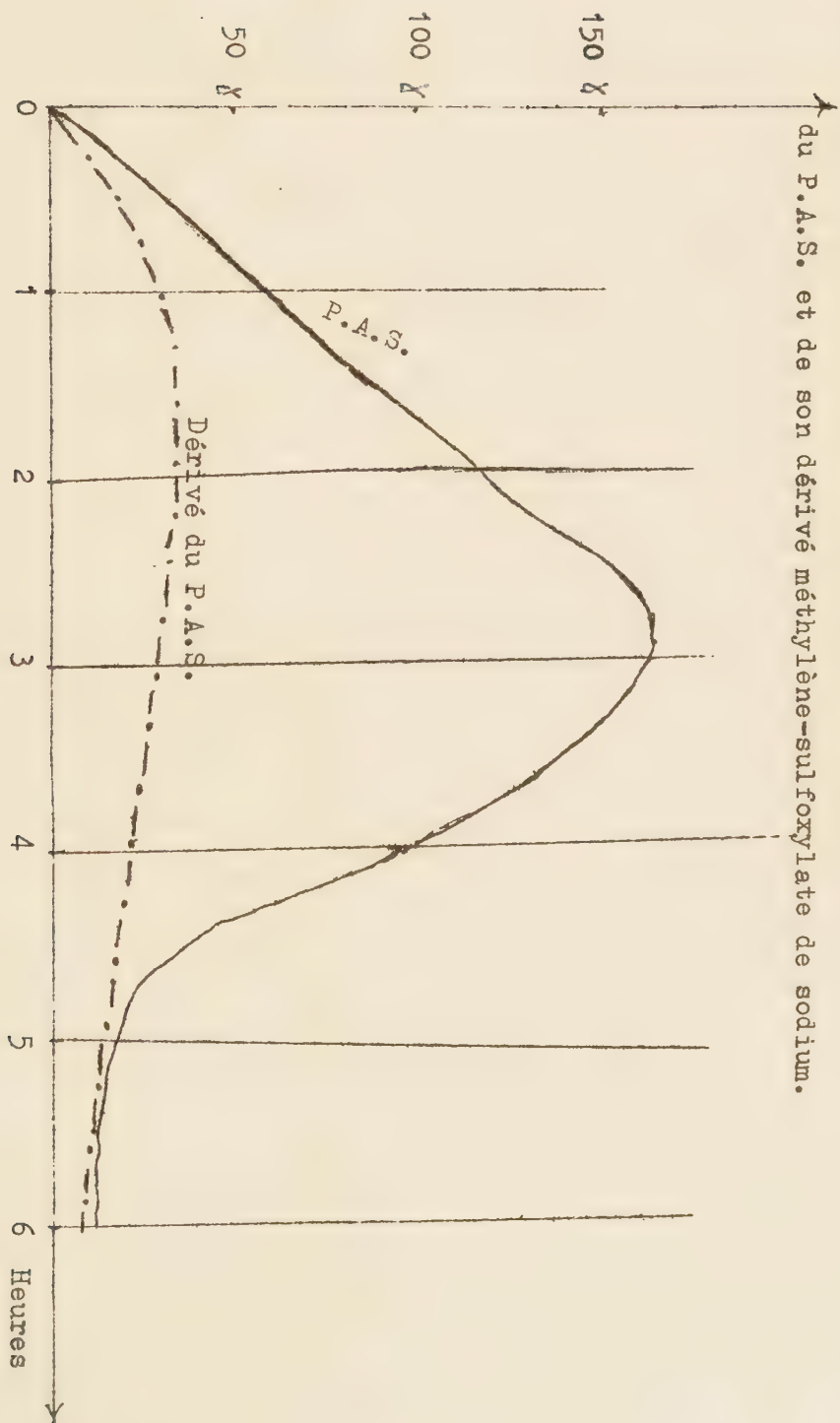
- On ajoute 1 ml de la solution d'acide trichloracétique. Il est inutile dans cette méthode de séparer les protéines qui précipitent en ce moment, car elles se dissolvent parfaitement dans la solution de thymol et leur présence ne gêne pas l'apparition de la coloration de la réaction de copulation.

- On introduit le tube à essai dans un cristalliseur plein de glace fondante, puis on ajoute successivement 1 ml de la solution de nitrite en agitant 2 à 5 minutes, puis ensuite 1 ml de la solution d'urée. On agite alors pendant 3 minutes. On termine en ajoutant 5 ml de la solution de thymol alcaline en agitant.

- On compare avec une solution étalon de P.A.S. préparée à partir de la solution à 20 par ml au spectrophotomètre Jobin-Yvon avec
= 4800 A

Les résultats des dosages obtenus après injection de 200 mg par kilo de chacune des substances à deux Lapins sont résumés dans le tableau ci-après et dans la figure 4. Nous voyons d'après la courbe obtenue à l'aide des prélèvements de sang faits toutes les heures jusqu'à la 7ème heure que le dérivé méthylènesulfoxyrate de sodium du P.A.S. ne libère pas par hydrolyse une quantité significative de P.A.S. libre dont la fonction amine saurait être évaluée par cette méthode.

Dosage de la fonction NH_2



C O N C L U S I O N S

1 - L'étude du rôle des réducteurs sur la croissance *in vitro* du bacille tuberculeux et sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du Cobaye, nous permet, d'après les résultats obtenus, de conclure que le problème du terrain chez le tuberculeux et en particulier celui du potentiel redox du milieu intérieur, joue un rôle non négligeable dans le traitement antituberculeux.

Des études en cours nous permettront ensuite de voir s'il y a lieu d'associer une substance réductrice telle que la rongalite ou la réductone avec les associations thérapeutiques déjà connues. Il est d'ores et déjà permis de penser qu'un réducteur puissant pourrait modifier les conditions d'apparition de la résistance du bacille de Koch aux divers produits tuberculostatiques.

2 - La diminution importante de la toxicité aiguë ou chronique des dérivés du méthylène-sulfoxylate, sans accompagnement d'une perte significative de l'activité tuberculostatique, permettrait aux cliniciens de mieux conduire les traitements d'attaque ou de longue durée, de la tuberculose ainsi que la lèpre.

3 - L'étude du mécanisme d'action nous permet de conclure enfin que ces dérivés du P.A.S. et de l'I.N.H. agissent par un mécanisme autre que la libération pure et simple du P.A.S. ou de l'I.N.H. par hydrolyse dans

le sang. Ces derniers résultats nous orientent nécessairement vers l'hypothèse selon laquelle les dérivés du P.A.S. et de l'I.N.H. que nous avons préparés ne se prêtent pas à l'acétylation dans l'organisme par le fait que les fonctions amine ou hydrazide sont déjà bloquées, ce qui pourrait d'une part changer certaines modalités des associations thérapeutiques et d'autre part être favorable dans le cas des sujets dits "acétyleurs" (26).

R E S U M E

=====

- 1 - Il a été synthétisé le thiocarbohydrazide, la triose-reductone, et deux nouveaux dérivés du méthylène-sulfoxyrate de sodium : le sel sodique de l'acide (N-méthylène-sulfoxyrate)-amino-4 hydroxy-2benzoïque, et le sel monosodique de (N-méthylène-sulfoxyrate)-isonicotinoylhydrazide.
- 2 - Les pouvoirs fortement réducteur et chélateur du thiocarbohydrazide nous ont incité à l'étudier comme nouveau réactif analytique. Ce réactif facilement abordable donne des réactions de coloration et de précipitation avec divers anions et divers cations. C'est en même temps un réactif des aldéhydes avec lesquels il donne des hydrazones vivement colorées. Il a été étudié, par titrage potentiométrique, le complexe qu'il forme avec l'ion Cu^{++} .
- 3 - Les réducteurs tels que l'acide ascorbique, le formaldéhyde sulfoxyrate de sodium ou la triose-réductone, employés à des concentrations de l'ordre de 10^{-3} entravent le développement in vitro de Mycobacterium tuberculosis, tandis que l'activité tuberculostatique in vitro du thiocarbohydrazide est de 10^{-5} .
- 4 - Le formaldéhyde sulfoxyrate de sodium ou rongalite, par son effet fortement réducteur, a pu retarder sensiblement l'évolution de la tuberculose expérimentale du Cobaye.

5 - Le sel sodique de (N-méthylène-sulfoxyate)-isonicotinoylhydrazide à la même activité tuberculostatique in vivo et in vitro que l'I N H si l'on tient compte du poids moléculaire. Mais l'étude comparative de la toxicité aigue chez la Souris, a montré que le sel sodique de (N-méthylène-sulfoxyate)-isonicotinoylhydrazide est dix fois moins toxique que l'I N H , tandis que le sel sodique de N-méthylène-sulfonate) isonicotinoylhydrazide est six fois moins toxique que l'I N H.

Aucun de ces trois produits ne donne la cytopénie sanguine chez les Souris de lignée Swiss.

6 - L'étude du mécanisme d'action faite après administration par voie parentérale et par voie orale a pu montrer que le sel sodique de N-méthylène-sulfoxyate isonicotinoyl-hydrazide ne s'hydrolyse pas dans l'organisme.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ALBERT (A.) (1953)

The affinity of isonicotinic hydrazide for metals.
(Experientia, 2, 370)

(2) ALBERT (A.) (1956)

Mode of action of isoniazid.
(Nature, London, 177, 525-526)

(3) ANGULANO (G.) et ANCIRA (G.) (1955)

Numération simultanée totale et différentielle directe des leucocytes
dans une chambre à numération.
(Acta Haematol. 13, 124.)

(4) AUTENRIETH (W.) et HEFNER (H.) (1925)

Über Versuche mit thiophosgen.
(Ber. deutsch. Chem. Ges. 58, 2154)

(5) BERGEL (M.) (1955)

Autooxydation de lipidos y quimioterapia de la tuberculosis.
(Rev. méd. Rosario, 45, 19-42)

(6) BOONE (I.V.), TURNEY (D.F.) et LANGHAM (W.H.) (1955)

Isoniazid in vitamin B6 - deficient rats.
(J. Lab. et chin. Med. 46, 549-559)

(7) BRETEY (J.) (1940)

Rôle joué par l'alimentation et les variations du taux d'acide ascorbique sur l'évolution de la tuberculose expérimentale du cobaye.
(C.R. Ac. Sc. 211, 815-817)

(8) de BRION (G.) et GRUEST (J.)

Isolément et maintien in vitro d'une souche essentiellement constituée de cellules épithéliales et obtenue à partir d'un rein de bovidé.
(Ann. Inst. Past. 1957, 92, 426-29.)

(9) BROUET (G.), MARCHE (J.), CHEVALLIER (J.), LIOT (F.), LE MEUR (G.) et Madame BERGOGNE (1959)

Etude expérimentale et clinique de la Kanamycine dans l'infection tuberculeuse.
(Revue de Tuberculose et de Pneumologie, 23, 949-988.)

(10) BUU-HOI (N.P.), TRAN BA LOC et XUONG (N.D.) (1955)

Contribution à la chimie du thiocarbohydrazide.
(Bull. Soc. Chin. Fr. 5, 694-697)

(11) CARLSON (H.B.), ANTHONY (E.M.), RUSSEL (W.F. Jr) et MIDDLEBROOK (G.) (1956)

Prophylaxis of isoniazid neuropathy with pyridoxine.
(New England J. Med. 255, 118-122)

(12) CHAMBON (M.) (1950)

Chimiothérapie des maladies à bacilles acido-résistants.
(Actualités pharmacologiques, 2^e série, Masson et Cie, Paris, 205-228)

(13) CRON (M.J.), FARDIG (O.R.), JOHNSON (D.L.), PALERMITI (F.M.), SCHMITZ (H.) et HOOPER (I.R.) (1958)

The chemistry of Kanamycin.
(Ann. New York Acad. Sc. 76, 27)

- (14) CYMERMAN (J.), RUBBO (S.D.), WILLIS (D.) et EDGAR (J.) (1955)
Mode of action of isonicotinic hydrazide.
(Nature, London, 176, 34-35)
- (15) DESBORDES (J.) et HENRY (J.) (1949)
A propos du dosage de l'acide para-amino-salicylique dans les produits biologiques.
(Ann. de Biol. Clin. 10, 11, 12, 461-63)
- (16) DICKENSON et KELLY
Fiches techniques Specia.
- (17) DUVAL (C.) et TRAN BA LOC (1955)
Applications variées du thiocarbohydrazide en chimie analytique.
(C.R. Ac. Sc. 240, 1097-9098)
- (18) EISMAN (P.C.), KONOPKA (E.A.), GISI (T.), MIZZONI (R.H.) et MAYER (R.L.) (1958)
The antituberculous activities of substituted thiazolines and thiazolidinones.
(Amer. Rev. Tuberc. 77, 703-711)
- (19) EULER (Von H.) und MARTIUS (C.) (1933)
Über Reduktion (Enol-tartroaldehyd) und Ascorbinsäure.
(Liebig Annalen, 505, 73-87)
- (20) EULER (Von H.) (1950)
Les réductones et quelques dérivés bactériostatiques.
(Produits Pharmaceutiques, 5, 513-19)
- (21) EULER (Von H.) et EISTERT (B.) (1957)
Chemie und Biochemie der Reduktone und Reduktonate.
(F. Enke Verlag, Stuttgart. 344 pages).

(22) FELDMAN (W.H.) (1946)

The chemotherapy of tuberculosis.

(J. of the Roy. of Publ. Health and Hyg. 9, 267-288; 297-324; 343-363)

(23) FOX (H.H.) et GIBAS (J.T.) (1956)

Synthetic tuberculostatics.

XI. Trialkyl and other derivatives of isonicotinyldiazine.

(J. Org. Chem. 21, 356-361)

(24) FOYE (W.C.) and JEFFREY (J.G.) (1955)

Metal chelates and antitubercular activity; o-hydroxyazo naphthols and phanthols.

(J. Am. Pharm. Assoc. Sc. Ed. 44, 257-260)

(25) GRUMBACH (F.) (1959)

La Souris, animal de diagnostic pour différencier les souches de bacilles tuberculeux avirulents ou de virulence atténuée pour le cobaye (souches BCG, souches dites "atypiques", souches isoniazido-résistantes).

(Annales de l'Institut Pasteur, 97, 453-465)

(26) GRUMBACH (F.), GROSSET (J.) et CANETTI (G.) (1960)

L'inactivation de l'isoniazide chez le rat. Son incidence sur les résultats de la chimiothérapie de la tuberculose dans cette espèce.

(Annales de l'Institut Pasteur, 98, 642-56)

(27) GUHA (P.C.) et DE (S.C.) (1924)

A new method for the preparation of thiocarbohydrazide mono and di-thio-pyrazine.

(J. Chem. Soc. 125, 1217)

(28) HECHT (A.) (1957)

Erfahrungsbericht über die Behandlung der Tuberkulose mit dem Hydrazid der Cyanessigsäure (Reazide)

(Tuberkuloseart, 2, 286-292)

(29) KRUGER-THIEMER (E.) (1957)

Biochemie des Isoniazide.

(TuberkForsch. Inst. Borstel, Jahresbericht Borstel, A, 299-509)

(30) LIBERMANN (D.), RIST (N.), GRUMBACH (F.) (1958)

Etudes dans le domaine de la chimiothérapie antituberculeuse. 6. Thioamides isonicotiques substitués en position 2 par un radical hydrocarburé.

(Bull. Soc. Chin. Fr. 5, 687-694)

(31) MAHER (J.R.), SPEYER (J.F.) et LEWINE (M.) (1957)

Mode of action of isoniazid.

(Am. Rev. Tuberc. 75, 517-518)

(32) MAREK (A.) (1956)

Erfahrungen mit der Empfindlichkeitsprüfung von TbcStämmen gegen Cyansigsäurehydrazid (CEH).

(Wien. Med. Wachr. 106, 754-757)

(33) MATHE (G.) et KLINE (D.L.) (1960)

Valeur de la formule leucocytaire. Comparaison des résultats obtenus par la numération différentielle directe en cellule et par la lecture d'un frottis.

(Revue d'Hématologie, 15, 352-355)

(34) MAURON (U.) et BUJARD (E.) (1956)

Antagonisme entre isonicotinyldiazide, cuivre et pyridoxal dans la transamination, substitution du pyridoxal par des analogues de structure.

(Bull. Soc. Chin. belge 65, 140-142)

(35) MIDDLEBROOK (G.) (1954)

Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli; preliminary report.

(Am. Rev. Tuberc. 69, 471-472)

(36) PAGET (M.) (1940)

Nouvelle technique de dosage colorimétrique des sulfamides dans les liquides biologiques.

(Bull. Soc. Chim. Biol. 22, 331)

(37) PEKNICE (J.R.) (1953)

Spektrophotometrische Bestimmung der Nikotinsäure durch Chloramin T.

(Cal. Farn. 2, 354)

(38) POLONOVSKI (M.)

Pathologie chimique (Masson Edit.) Tome II, p.1289.

(39) POOLE (N.F.) et MEYER (A.E.) (1958)

Comparison of new chemical method of determining isonicotinoyl hydrazid in serum with microbiological assay.

(Proc. Soc. Expr. Biol. Med. 98, 375)

(40) RIST (N.), GRUMBACH (F.), LIBERMANN (D.) et coll. (1959)

Un nouveau médicament antituberculeux actif sur les bacilles isoniazido-résistants : le thioamide de l'acide α -éthyl isonicotique. (Etude expérimentale)

(Rev. Tuberc. Paris, 278-283)

(41) ROSEN (F.) (1955)

Effect of isonicotinic acid hydrazide on niacin and pyridoxine metabolism in Rats.

(Proc. Soc. exp. Biol. Med. 88, 243-246)

(42) ROTH (W.), ZUBER (F.), SORKIN (E.) et ERLÉN MEYER (H.) (1951)

Über die Eigenschaften einigen Metall Komplexe der B. Amino-salicylsäure. (Helv. Chim. Acta, 34, 430-433)

- (43) RUBIN (S.H.), DREKTER (L.), SCHEINER (J.) et DE RITTER (E.) (1952)
Determination of blood plasma levels of hydrazin derivatives of isonicotinic acid.
(Discuses of Chest. 21, 439)
- (44) SCOTT (P.G.W.) (1952)
The detection and determination of isonicotinylhydrazide.
(J. Pharm. and Pharmacol. 4, 681)
- (45) SORKIN (E.), ROTH (W.) et ERLIENMEYER (H.) (1952)
Über die Beeinflussung tuberkulostatischer wirkungen durch eu.
(Helv. chin. Acta, 35, 1736-1741)
- (46) STOLLE (R.) et BOWLES (P.E.) (1908)
Über Thiocarbonyldiazid.
(Ber. deutsch. Chem. Ges. 41, 1099)
- (47) UMEZAWA (H.), UEDA (M.), MAEDA (K.), YAGISHITA (K.), KONDO (S.), OKAMI (Y.),
UTAHARA (R.), OSATO (Y.), NITTA (K.) et TAKENCHI (T.) (1957)
Production and isolation of a new antibiotic, Kanamycin.
(J. Antibiotics, Japan, 10, 107)
- (48) UMEZAWA (H.) (1958)
Discovery of Kanamycin and basic studies.
(J. Japan M.A., 39, 713)
- (49) WILLETT (H.P.) (1958)
Inhibition of Diaminopimelic acid decarboxylase activity in Pycobacterium tuberculosis by Isonicotinic Acid hydrazide.
(Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 99, 177-179)

(50) WURMSER (R.) et GELOSO (J.) (1928)

Sur le potentiel des solutions de glucides I.
(J. Chem. Phys. 25, 644-657)

(51) WURMSER (R.) et GELOSO (J.) (1929)

Sur le potentiel des solutions de glucides II.
(J. Chem. Phys. 26, 424-434)

(52) WURMSER (R.) et GELOSO (J.) (1931)

Sur le potentiel limite des solutions de glucides III.
(J. Chem. Phys. 28, 260-276)

(53) YANTCHITCH (M.) (1954)

Micro-dosage colorimétrique de l'hydrazide isonicotinique dans le sang
et autres liquides biologiques.
(Ann. Biol. Clin. 5, 328-29).

TABLE DES MATIERES

=====

	Pages
Introduction à la chimiothérapie antituberculeuse	1
Historique	3
Classification des substances tuberculostatiques	4
Mécanisme d'action des substances tuberculostatiques connues....	10
Etudes faites dans le présent travail	16
Synthèse du thiocarbohydrazide	20
Synthèse de la triose-réductone	21
Synthèse du sel monosodique de N-(méthylène-sulfoxyate)-isoni- cotinoylhydrazide	24
Préparation du sel disodique de l'acide N-(méthylène-sulfoxyate)- amino-4 hydroxy-2 benzoïque.....	25
Etude analytique du thiocarbohydrazide	28
Etude potentiométrique du chélate cuprique du thiocarbohydrazide	34
Etude du rôle des réducteurs sur Mycobacterium tuberculosis....	38
Etude de l'activité tuberculostatique du sel monosodique de N-(mé- thylène-sulfoxyate)-isonicotinoylhydrazide	41
Etude du sel disodique de l'acide N-(méthylène-sulfoxyate)-amino- 4 hydroxy-2 benzoïque	42
Etude comparative de toxicité aiguë de l'I N H et de ses deux déri- vés.....	49
Calcul d'erreur	55
Etude comparative de toxicité cellulaire de l'I N H et de ses dérivés	56
Etude comparative de toxicité sanguine de l'I N H et de ses dérivés	58
Dosage dans le sérum de l'I N H et de son dérivé méthylène-sul- foxyate de sodium par leur noyau pyridinique	68

Dosage différentiel dans le sérum de l'I N H et de son dérivé méthylène sulfoxyate par la fonction hydrazide libre	73
Etude du mécanisme d'action par voie buccale chez le lapin	76
Etude du mécanisme d'action du dérivé méthylène-sulfoxyate du P.A.S.....	79
Dosage différentiel dans le sérum du P.A.S. et de son dérivé méthylène sulfoxyate de sodium à l'aide de la fonction amine..	84
Conclusions générales	87
Résumé	89
Bibliographie	I

DEUXIEME THESE

Proposition donnée par la Faculté : VIRUS ET CANCERS

Vu et approuvé

Paris le 20 Mars 1961

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie

G. VALETTE

Vu et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

J. SARRAILH



AGEMP
POLYCOPIE

8, rue Dante
PARIS - V^e
Téléphone : ODÉon 58-90